

Aus der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Infektionsabteilung der Medizinischen Poliklinik

Leiter: Prof. Dr. med. J. Bogner

**Untersuchung des
mitochondrialen Membranpotentials und der Apoptoserate
peripherer mononukleärer Blutzellen
HIV-positiver, bisher nicht antiretroviral behandelter Patienten**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Annette Tischleder
aus Trier

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichtersteller:

Prof. Dr. med. Johannes Bogner

Mitberichtersteller:

Prof. Dr. Hans-Werner Ziegler-Heitbrock

Priv. Doz. Dr. Uwe Ködel

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. T. Sternfeld

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung:

11.12.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Mitochondrium.....	5
1.1.1	Aufbau und Funktion.....	5
1.1.2	Mitochondriales Membranpotential.....	6
1.2	Programmierter Zelltod (Apoptose).....	7
1.2.1	Molekularer Mechanismus der apoptotischen Signalübertragung.....	9
1.2.2	Regulatoren der Apoptose.....	11
1.3	HIV und AIDS.....	11
1.3.1	Struktur und Replikation des HI-Virus.....	12
1.3.2	Das Lymphgewebe als Ort des Virusreservoirs.....	14
1.3.3	Krankheitsverlauf und Immunpathogenese.....	14
1.4	HIV und Apoptose der CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	16
1.5	Fragestellung.....	17
2	Probanden, Material und Methodik	19
2.1	Probanden.....	19
2.2	Material.....	19
2.3	Methodik.....	19
2.3.1	Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Vollblut.....	20
2.3.2	Trypanblau-Färbung.....	21
2.3.3	Durchflusszytometrie.....	22
2.3.4	Statistische Methoden.....	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Demographische Charakteristika und klinische Parameter der teilnehmenden Probanden.....	31
3.2	Mitochondriales Membranpotential und Apoptoserate.....	39
3.3	Immunstatus und Mitochondrienfunktion.....	41
3.4	Viruslast und Mitochondrienfunktion.....	45
3.5	Infektionsdauer und Mitochondrienfunktion.....	46
3.5.1	Patienten mit progredientem Infektionsverlauf.....	46
3.5.2	<i>Long term non progressors</i>	49
3.6	Geschlecht und Mitochondrienfunktion.....	50
3.7	Hepatitis und Mitochondrienfunktion.....	53

4	Diskussion	54
4.1	HIV und Apoptoserate beziehungsweise mitochondriales Membranpotential.....	54
4.1.1	HIV-Infektion und Apoptoserate.....	54
4.1.2	HIV-Verlaufsparameter und Apoptoserate.....	56
4.1.3	HIV-Infektion und mitochondriales Membranpotential.....	58
4.1.4	HIV-Verlaufsparameter und mitochondriales Membranpotential.....	60
4.2	Apoptoserate und mitochondriales Membranpotential.....	61
4.3	Weitere Einflussfaktoren auf die Mitochondrienfunktion.....	62
4.4	Therapieansätze zur Verminderung der Apoptoserate und der mitochondrialen Dysfunktion.....	63
4.5	Infektionsdauer und Apoptoserate beziehungsweise mitochondriales Membranpotential.....	64
4.5.1	Patienten mit progredientem Infektionsverlauf.....	64
4.5.2	<i>Long term non progressors</i>	64
4.6	Geschlecht und Apoptoserate beziehungsweise mitochondriales Membranpotential.....	65
4.7	HIV-/ Hepatitis-Koinfektion und Apoptoserate beziehungsweise mitochondriales Membranpotential.....	66
4.8	Limitation.....	67
4.9	Ausblick.....	67
5	Zusammenfassung	69
6	Anhang	71
6.1	Materialien.....	71
6.1.1	Geräte.....	71
6.1.2	Verbrauchsmaterial.....	72
6.1.3	Probenmaterial, Reagenzien und Medium.....	73
6.1.4	Software.....	74
7	Verzeichnisse	75
7.1	Abkürzungen.....	75
7.2	Abbildungen.....	78
7.3	Tabellen.....	81
7.4	Literatur.....	82
8	Danksagung	91
9	Lebenslauf	92

1 Einleitung

1.1 Mitochondrium

1.1.1 Aufbau und Funktion

Mitochondrien (Abbildung 1) sind meist länglich ovale Zellorganellen mit einem Durchmesser von 0,5–1 μm und einer Länge von 1–4 μm . Für die Eukaryontenzellen stellen sie den wichtigsten Ort der Energiegewinnung dar. Die Energie entsteht in Form von Adenosintriphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung. Daneben gelten u. a. die Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) und die Thermogenese als Hauptaufgaben der Mitochondrien. Mit Ausnahme der Erythrozyten beinhalten alle Zellen Mitochondrien. Lymphozyten enthalten nur wenige Mitochondrien, etwa 10-20, Hepatozyten hingegen einige hundert bis tausend. Ihre Form, Anzahl und Positionierung in der Zelle differiert je nach Zelltyp und dessen Energiebedarf (Cossarizza, A. et al. 2004). Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgeben. Dadurch entstehen zwei getrennte Kompartimente, die interne Matrix und der Membranzwischenraum. Die Lipiddoppelschicht der Außenmembran ist für kleine Proteine und Moleküle mit einer geringeren Größe als 5000 Dalton durchlässig. In ihr sind Kanäle aus dem Transportprotein Porin lokalisiert. An die Außenmembran anschließend, durch einen schmalen Membranzwischenraum getrennt, befindet sich eine hochspezialisierte Innenmembran, die sich in die Matrix einstülpt. Die Einstülpungen, Cristae genannt, dienen der Oberflächenvergrößerung der inneren Membran. An der Anzahl und dem Ausmaß der Cristae erkennt man die Abhängigkeit der jeweiligen Zelle von der Atmungsaktivität und somit vom Energiegewinn. Die Atmungskette und ATP-Synthase sind an der Innenmembran lokalisiert. Die Lipiddoppelschicht der inneren Membran enthält Cardiolipin, das die Membran für Ionen besonders undurchlässig macht. Moleküle können nur durch die Innenmembran permeieren, wenn für sie spezielle Transportproteine vorhanden sind (Capaldi, R.A. 1982). In der Mitochondrienmatrix finden sich unter anderem das mitochondriale Genom (mtDNA), Ribosomen, die Enzyme des Zitronensäurezyklus und die Enzyme der Oxidation von Pyruvat und Fettsäuren zu Acetyl-CoA (Alberts, B. et al. 2002).

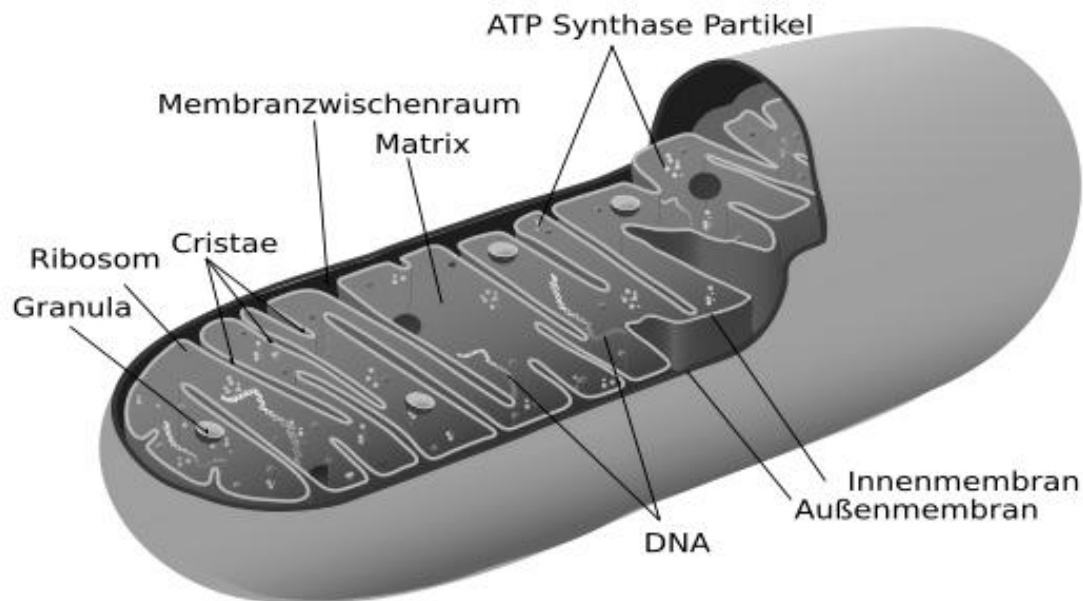


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Mitochondriums (Ruiz, M. 2006).

1.1.2 Mitochondriales Membranpotential

An der mitochondrialen Innenmembran sind die Elektronentransportkette (Atmungskette) und die ATP-Synthase lokalisiert. Sie sind für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP für den Zellstoffwechsel von größter Bedeutung. An der Elektronentransportkette sind die Enzymkomplexe I bis V und die Protonen- und Elektronenüberträger Ubichinon (Coenzym Q) und Cytochrom c beteiligt. NADH und FADH_2 , aus dem Zitronensäurezyklus stammend, werden reduziert und setzen Protonen und energiereiche Elektronen frei. Die energiereichen Elektronen treiben Redoxreaktionen in den Enzymkomplexen an, Protonen werden über die Innenmembran aus der Matrix in den Membranzwischenraum transportiert und bilden einen Protonen- und einen Spannungsgradienten, das mitochondriale Membranpotential (Löffler, G. 1998). Dabei wird die Innenseite der Membran negativ und die Außenseite positiv geladen. Der entstandene elektrochemische Protonengradient treibt die ATP-Synthase zu Bildung von ATP an (Abbildung 2).

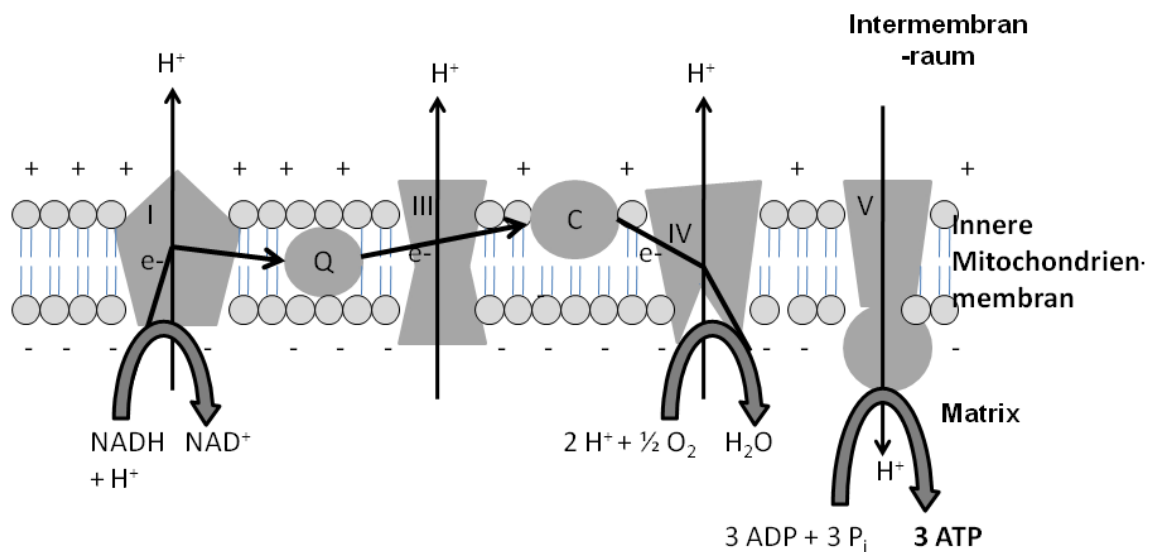


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Atmungskettenkomplexe in der Mitochondrienmembran. Die von Komplex I, III und IV gepumpten Protonen (H^+) erzeugen einen Protonengradienten über die innere Membran. Komplex V (ATP-Synthase) bildet ATP. Die Elektronen (e^-) aus der Reduktion von NADH fließen über Komplex I, Coenzym Q, Komplex III, Cytochrom c und Komplex IV und ermöglichen die Bildung von H_2O . Verändert nach (Follmann, K.K. 1998)

Der elektrochemische Protonengradient übt eine Triebkraft aus, die man in Millivolt (mV) messen kann. In einer typischen Zelle beträgt diese protonenmotorische Kraft eines Mitochondriums etwa 200 mV. Die meiste Kraft ist im mitochondrialen Membranpotential (MMP) gespeichert (~140 mV), der Protonengradient steuert mit etwa 60 mV die Kraft einer pH-Einheit bei. Man betrachtet vereinfachend nur das MMP als Indikator für den Energiestatus eines Mitochondriums. Es ist vor allem für Zellen mit hohem Energiebedarf von größter Bedeutung (Mathur, A. et al. 2000). Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials ermöglicht somit qualifizierte Aussagen über den Zustand der Mitochondrien bzw. über den Einfluss von z.B. Virusproteinen oder Medikamenten auf deren Funktion.

1.2 Programmierter Zelltod (Apoptose)

Zellteilung und Zelltod halten sich im gesunden, reifen Gewebe die Waage. Grundsätzlich wird zwischen zwei Hauptwegen des Zelltodes unterschieden: dem programmierten Zelltod und der Nekrose (Abbildung 3) (Wohna, A. et al. 2007). Die Nekrose ist die Reaktion der Zelle auf physikalische oder chemische Noxen. Sie

führt über die Funktionsuntüchtigkeit zum Zugrundegehen der Zelle mit anschließender Phagozytose. Die Zelle schwillt an, die Integrität der Membranen geht verloren, Zellorganellen und Zytosol werden in den Extrazellulärraum freigesetzt („*Blebbing*“). Durch das Freisetzen des Zellinhaltes wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen (Leist, M. et al. 2001). Der programmierte Zelltod ist im Gegensatz dazu ein aktiv von der Zelle gesteuerter Untergang. Besonders bei stark proliferierenden Geweben wie Hepatozyten oder Blutzellen reguliert er die physiologische Entwicklung, von der Embryonalentwicklung an über die Differenzierung und Funktion des Nerven- und Immunsystems bis hin zur Wachstumskontrolle (Ellis, R.E. et al. 1991). Kranke oder entartete Zellen werden durch Apoptose eliminiert (Jacobson, M.D. et al. 1997).

DNA-Schädigungen z.B. durch UV-Licht oder Chemotherapeutika, oxidativer Stress, Virusinfektionen oder der Entzug von Wachstumsfaktoren können die Einleitung des programmierten Zelltodes auslösen. Die Apoptose ist eine spezifische, biochemisch und morphologisch definierte Form des programmierten Zelltodes. Hierbei ist eine morphologische Veränderung nach Aktivierung einer intrazellulären, proteolytischen Maschinerie aus Caspasen (Cysteiny-Aspartasen) wesentlich. Die morphologischen Veränderungen werden charakterisiert durch das Schrumpfen der Zellen, das Ausstülpfen der Membranen und den Verlust des Kontaktes zum Zellverbund. Parallel erfolgt Kondensation und eine spezifische Fragmentierung des Chromatins (Vander Heiden, M.G. et al. 1997), (Kerr, J.F. et al. 1972). Der Zellinhalt schnürt sich in Vesikeln, den so genannten apoptotischen Körperchen ab („*Budding*“). Diese Körperchen werden dann ohne Entzündungsreaktion von benachbarten Zellen phagozytiert (Fadok, V.A. et al. 1998).

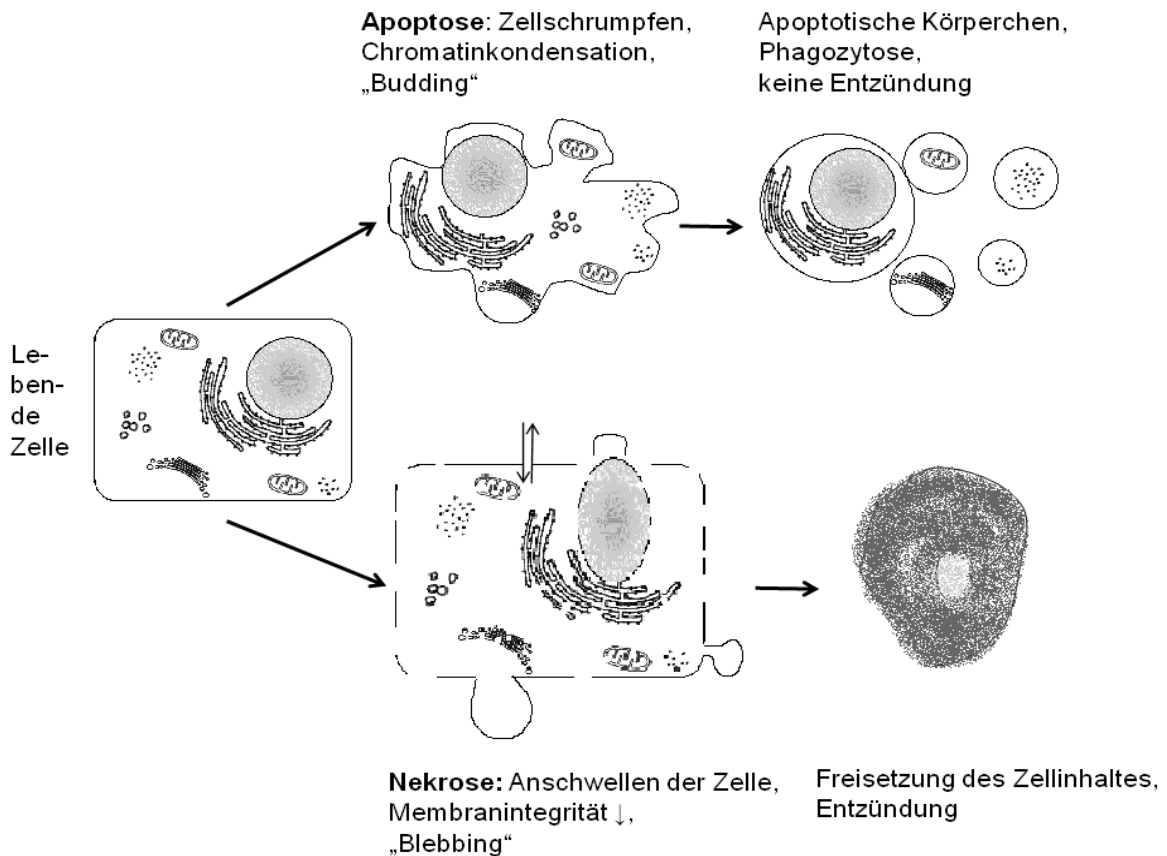


Abbildung 3: Charakteristischer Ablauf des Zelltodes einer Zelle: Apoptose im Gegensatz zur Nekrose. Verändert nach (Van Cruchten, S. et al. 2002) und (Hoffmeister, H. 2005)

1.2.1 Molekularer Mechanismus der apoptotischen Signalübertragung

Die Apoptose kann durch verschiedenste Impulse innerhalb oder außerhalb der Zelle wie z. B. durch Bindung bestimmter Faktoren an deren Oberflächenrezeptoren oder durch Schäden der DNA oder der DNA-Reparaturmechanismen aktiviert werden. So unterscheidet man zwei apoptotische Wege, den extrinsischen, todesrezeptor-vermittelten Weg und den intrinsischen, mitochondrienvermittelten Weg (Fuentes-Prior, P. et al. 2004), (Adams, J.M. 2003). Diese sind schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

Der extrinsische Apoptosesignalweg

Alle Zellen enthalten ein streng reguliertes System inaktiver Procaspasen, die durch Aktivierung die Caspasenkaskade anstoßen und somit die Apoptose in Gang bringen. Eine Möglichkeit diese Maschinerie zu aktivieren ist die Bindung spezifischer Liganden an Oberflächenrezeptoren der TNF-Familie (z. B. FAS). Solche Liganden sind beispielsweise Tumornekrosefaktoren (TNF, FAS-Ligand) oder

andere Zytokine, die durch T-Lymphozyten gebildet werden können. Bindet z. B. ein FAS-Ligand (CD178) an einen FAS-Rezeptor (CD95), ballen sich mehrere FAS-Proteine auf der Zelloberfläche zusammen und bilden Komplexe mit intrazellulären Adapterproteinen. An diese binden Procaspase 8-Moleküle, die sich gegenseitig durch Spaltung aktivieren. Die so aktivierten Caspase 8-Moleküle aktivieren dann als Initiatorcaspasen ihrerseits weitere Procaspasen und setzen über die nun als Effektorcaspasen fungierenden Proteine die gesamte Caspasekaskade in Gang.

Der intrinsische Apoptosesignalweg

Der intrinsische Signalweg kann durch Zellzyklusdefekte, DNA-Schäden oder oxidativen Stress induziert werden. Typischerweise wird er durch die Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien gestartet. Cytochrom c bindet im Zytosol an das Adapterprotein Apaf-1 und aggregiert. Dann folgt die Bindung und Aggregation der Procaspase 9, wodurch diese als aktivierte Caspase 9 die Todeskaskade anstößt (Green, D.R. et al. 1998).

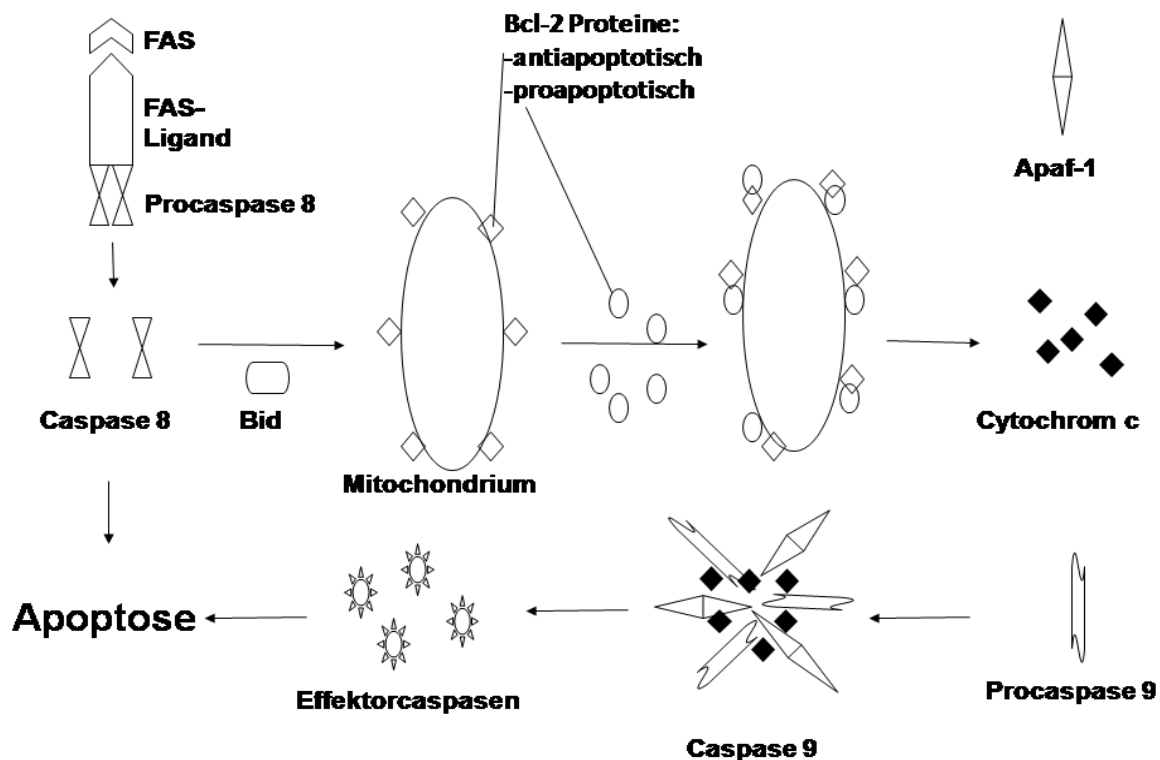


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Apoptosesignalwege. Verändert nach (Schulze-Osthoff, K. 2002)

1.2.2 Regulatoren der Apoptose

Die Caspaseaktivierung kann durch bestimmte intrazelluläre Proteine und Gene reguliert werden. Diese können apoptosefördernde oder –hemmende Wirkung aufweisen. Dazu zählen die Proteine der Bcl-2-Familie und der IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*)-Familie (Cory, S. et al. 2003). Tumorsuppressorgene wie p53 wirken apoptoseinduzierend. Apoptosepromotoren sind Bad, welches zelltodhemmende Mitglieder seiner Bcl-2-Familie bindet und inaktiviert, Bax und Bak, die die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien fördern. Apoptoseschutz erfährt die Zelle durch die Bcl-2-Familien Proteine Bcl-2 oder Bcl-XL, welche die Cytochrom c Freisetzung hemmen. Die IAP sind weitere wichtige Kontrollinstrumente der Zelle. Diese binden entweder an Procaspasen und verhindern deren Aktivierung oder blockieren bereits aktivierte Caspasen.

1.3 HIV und AIDS

Das humane Immunschwächevirus (HIV, *human immunodeficiency virus*) ist seit 1983 als ursächlicher Erreger für die Entstehung der Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) bekannt (Barre-Sinoussi, F. et al. 1983), (Gallo, R.C. et al. 1983). Sie wurde erstmals 1981 bei einer Gruppe homosexueller Männer mit dem Auftreten schwerer opportunistischer Infektionen beschrieben. Die Übertragung von HIV erfolgt in der Regel auf sexuellem oder parenteralem Weg. Aktuelle Daten des Robert Koch-Institutes sprechen von ~59.000 HIV-infizierten Menschen in Deutschland, davon leben ~9.500 mit AIDS. Jährlich ist mit ~3.000 Neuinfektionen zu rechnen. Seit Anfang der Epidemie sind in Deutschland ~27.000 Menschen an AIDS gestorben (Hamouda, O. 2007). Weltweit sind ~33,2 Millionen Menschen mit HIV infiziert, bzw. an AIDS erkrankt. Die Neuinfektionsrate liegt bei ~2,5 Millionen/Jahr. Allein 2007 rechnet man mit ~2,7 Millionen Todesopfern weltweit (Hamouda, O. 2007).

HIV ist ein umhülltes RNA-Virus. Es gehört zu der Familie der Retroviren und der Gattung der Lentiviren. Das Virus wird in 2 Stämme unterteilt. HIV-1, mit den Hauptgruppen M, N, O und weiteren Subgruppen (Korber, B. et al. 1999), ist weltweit vertreten und verantwortlich für die globale Pandemie. Die Verbreitung des wahrscheinlich weniger virulenten HIV-2 ist im Wesentlichen auf Westafrika beschränkt (Clavel, F. et al. 1986).

1.3.1 Struktur und Replikation des HI-Virus

Struktur

HIV zählt zu den (+)-Einzelstrang RNA-Viren. Das Virion hat einen Durchmesser von ca. 100 nm. Es enthält einen Kern (Core), dessen Hülle aus dem Kapsidprotein ($p24^{gag}$) besteht. Darin liegen die Enzyme Protease ($p10^{pol}$) und Integrase ($p34^{pol}$) und zwei Kopien viraler RNA, daran gebunden das Nukleoprotein ($p7^{gag}$) und die Reverse Transkriptase ($p55^{pol}$, $p61^{pol}$). Den Kern umschließt eine aus Matrixprotein ($p17^{gag}$) gebildete Matrix, die mit der Virushülle verankert ist. Die Virushülle besteht aus transmembranalem Glykoprotein ($gp41^{env}$) und nicht kovalent an der Oberfläche gebundenem Glykoprotein ($gp120^{env}$) in einer Phospholipiddoppelschicht. Die beiden Stämme des HI-Virus 1 und 2 gleichen sich im elektronenmikroskopischen Bild, unterscheiden sich aber hinsichtlich der Anordnung der Regulatorgene und der Molekülmasse ihrer Proteine. Struktur und Genkartierung des HIV-1 sind zur Veranschaulichung in Abbildung 5 und Tabelle 1 dargestellt.

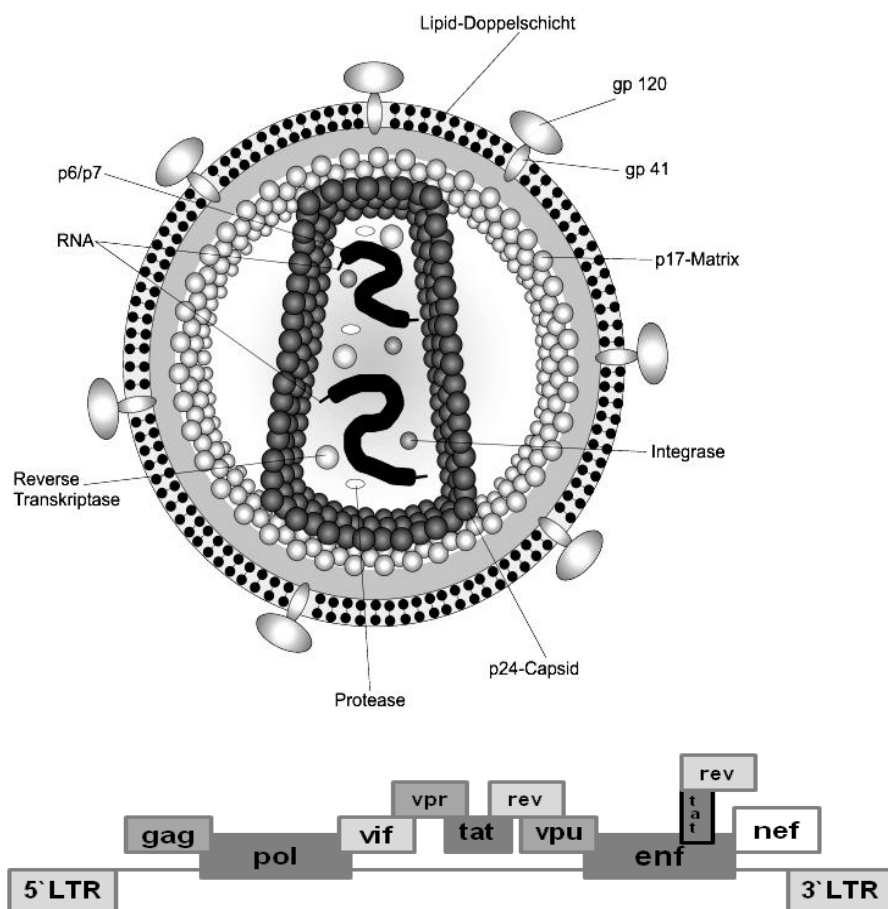


Abbildung 5: Struktur und Genkarte des HIV-1. Verändert nach (Beyer, D. 1997)

Tabelle 1: Genprodukte des HIV-1

Strukturproteine		Regulatorproteine	
Gen	kodiert	Gen	kodiert
ltr	long terminal repeats (Transkriptionskontrolle)	vif	viraler Infektiösitätsfaktor p24
gag	gruppen-spezifische Antigene p24 Kapsidprotein p17 Matrixprotein p7 Nukleoprotein	vpr	schwacher Transkriptionsaktivator p15
pol	Reverse Transkriptase p55, p61 Protease p10 Integrase p34	vpu	Verstärkt Virusfreisetzung durch Membranen p16 Stimuliert intrazellulären Abbau von CD4
env	Transmembran -glykoproteine gp41 gp120	tat	Transaktivatorprotein, steuert Virustranskription p14
		rev	ermöglicht Export viraler mRNA aus dem Zellkern p19/20
		nef	Pathogenitätsfaktor p28/27 verstärkt Virusreplikation

Replikation

Das Glykoprotein CD4 fungiert als primärer Rezeptor für HIV. Es wird an der Oberfläche von Zellen wie T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen- und Mikrogliazellen exprimiert. CD4 ist in vier extrazellulären, immunglobulinähnlichen Bereichen strukturiert, die eine doppelte β -Faltblattstruktur aufweisen. Es bindet an bestimmte Bereiche des HIV-Glykoproteins gp120. Dies führt zu einer Konformationsänderung von gp120, was die Bindung an einen weiteren Rezeptor ermöglicht. In erster Linie dienen Chemokinrezeptoren als Korezeptoren für das Eindringen des Virus in die Wirtszelle (Doerr, H.W. et al. 2004). Monozytrotrope HIV-Isolate nutzen dafür den CCR5-Rezeptor, T-zelltrope Virusisolate den CXCR4-Rezeptor (Goebel, F.D. et al. 2000). Der entstandene Komplex aus CD4, gp120 und dem Korezeptor bewirkt eine konformationelle Änderung des HIV-Glykoproteins gp41. Es kommt zur Fusion der HI-Virushülle und der Zielzellmembran, so dass der Viruskern in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangt („*uncoating*“). Die (+)-Einzelstrang RNA wird durch eine RNA-abhängige Polymerase, die Reverse Transkriptase, erst in (-)-Einzelstrang DNA, dann in provirale

Doppelstrang DNA umgeschrieben. In aktivierten T-Lymphozyten vermittelt die virale Integrase die Integration der proviralen DNA in die Wirts-DNA, wodurch ein sogenanntes Provirus entsteht. Dieses Provirus wird wie nichtinfiziertes Genom bei der Zellteilung weitergegeben. Die Proteinsequenzen Itr (*long terminal repeats*) des Provirus sorgen dafür, dass es bevorzugt transkribiert wird. So wird mit Hilfe der Wirtspolymerase verstärkt virale mRNA produziert. Diese kann als (+)-Einzelstrang RNA verpackt und aus der Zelle geschleust werden oder aus ihr werden direkt an Wirtsribosomen Virusproteine synthetisiert. Das daraus zusammengebaute Virus verlässt durch Aussprossung die Wirtszelle.

1.3.2 Das Lymphgewebe als Ort des Virusreservoirs

Das Lymphgewebe, in dem infizierte CD4⁺ T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen vorkommen, dient dem HI-Virus als Hauptreservoir. 95 % der im Plasma zirkulierenden Viren stammen von produktiv infizierten CD4⁺ T-Lymphozyten. Diese Zellen, mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von ca. zwei Tagen, kommen im T-Zellbereich des lymphatischen Gewebes vor. Vermutlich ist ihre Aktivierung im Zusammenhang mit der Immunantwort ihr Todesurteil. Latent infizierte CD4⁺ Gedächtniszellen dienen ferner als Virusreservoir. Die Produktion der Viren beginnt nach Aktivierung der Gedächtniszelle durch ein präsentiertes Antigen. Während ihrer Halbwertszeit von ca. zwei bis drei Wochen ab dem Zeitpunkt der Infektion kann sich HIV von ihnen aus auf andere aktivierte Zellen ausbreiten. Makrophagen und dendritische Zellen beherbergen ebenso sich replizierende Viren. Sie scheinen dadurch keinen Funktionsverlust zu erleiden und stellen deshalb einen erheblichen Virenspeicher dar. Zudem wird HIV von follikulär dendritischen Zellen an ihrer Oberfläche in Form von Immunkomplexen festgehalten. Selber nicht infiziert, dienen diese Zellen infektiösen Viren eventuell als Speicherort (Janeway, C.A. et al. 2002).

1.3.3 Krankheitsverlauf und Immunpathogenese

Der natürliche Verlauf einer HIV-Infektion ist in drei Stadien unterteilt, die akute HIV-Infektion, die chronische Phase und AIDS. Die akute Phase der HIV-Infektion zeigt sich im Normalfall mit vorübergehenden Symptomen, ähnlich eines grippalen Infektes. Die Anzahl der im peripheren Blutkreislauf zirkulierenden Viren steigt stark an, sie erreicht Werte von bis zu 10⁶ Kopien von HIV-RNA/ml Plasma (Kahn, J.O. et

al. 1998). Die Anzahl der CD4⁺ T-Lymphozyten im peripheren Blut sinkt ab. Auch die Anzahl der CD4⁺CCR5⁺ T-Gedächtniszellen des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes sinkt (Derdeyn, C.A. et al. 2005). Die Präsenz der HI-Viren löst eine adaptive Immunantwort aus. Es werden zytotoxische, CD8⁺ T-Lymphozyten (CTL) und T_H1-Zellen aktiviert, die sich spezifisch gegen infizierte Zellen richten (Bevan, M.J. 2004). Von diesen Zellen werden Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interferon γ (INF γ) und Interleukin 2 (IL 2) sezerniert, die die Effektorfunktion des Immunsystems unterstützen (Pantaleo, G. et al. 2004). Zeitlich korreliert das Auftreten der CTL und T_H1-Zellen mit der Abnahme der peripheren Viruslast nach der Primärinfektion. Etwas zeitversetzt werden HIV-spezifische Antikörper gebildet, es kommt zur Serokonversion, die Viruslast nimmt wieder ab, die CD4⁺ T-Lymphozyten erholen sich. Diese Phase spielt sich in einem Zeitraum von vier bis acht Wochen ab. Die Höhe der CD4⁺ T-Zellzahl nach der Primärinfektion gilt momentan als quantitativer Marker für den weiteren Verlauf der Erkrankung. Es folgt die asymptomatische Phase der klinischen Latenz über eine durchschnittliche Dauer von zehn Jahren. Sie ist charakterisiert durch einen langsamen, aber stetigen Abfall der CD4⁺ T-Lymphozyten im peripheren Blut, einer mehr oder weniger gleichbleibenden Zahl infizierter CD4⁺ T-Lymphozyten und einer erhöhten Apoptoserate bei sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺ T-Zellen. Die erhöhte Apoptoserate als Ausdruck für die generalisierte Immunaktivierung scheint für den schließlichen Abfall der CD4⁺ Helferzellen ursächlich zu sein (Derdeyn, C.A. et al. 2005). Des Weiteren scheint der Verlust der CD4⁺ T-Lymphozyten durch HIV-Proteine direkt (env), durch Caspaseaktivierung (vpr), über Apoptoseinduktion durch Kontakt infizierter und gesunder Zellen (FAS/ FAS-Ligand), bzw. durch direktes Abtöten durch CD8⁺ T-Lymphozyten gekennzeichnet zu sein (Rubbert, A. et al. 2007). Diese Mechanismen werden im folgenden Abschnitt 1.4 näher beschrieben. Die Immunantwort gegen das Virus führt zu einer Hyperaktivierung des Immunsystems, in aktivierten T-Lymphozyten vermehrt sich das Virus, so entsteht der Teufelskreis, der zu der Depletion der CD4⁺ Helferzellen führt (Hazenbergh, M.D. et al. 2003) (Picker, L.J. 2006). In der letzten Phase der Erkrankung versagt durch die geringe Anzahl und gestörte Funktion der CD4⁺ T-Zellen die zelluläre Immunantwort. Ab einem Schwellenwert von 500 CD4⁺ Helferzellen/ μ l Blut steigt die Anfälligkeit für opportunistische Infektionen. Nach dem gleichzeitigen Auftreten spezifischer Symptome, aggressiver Formen des Kaposi-Sarkoms oder von B-Zell-Lymphomen

definiert man das Auftreten von AIDS. Ohne Behandlung führen diese Erkrankungen ab diesem Zeitpunkt innerhalb einiger Monate bis weniger Jahre zum Tod. Ein sehr geringer Prozentsatz infizierter Patienten zeigt eine fehlende oder deutlich verlangsamte Krankheitsprogression. Bei diesen sogenannten „*long term non progressors*“ bleibt die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen stabil, es zirkulieren erstaunlich wenige Viren im Blut. Mögliche Erklärungen hierfür sind eine erhöhte Immunantwort durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, eventuell durch Sezernierung von Zytokinen, Chemokinen oder humanen Defensinen (Zhang, L. et al. 2002) oder eine erhöhte Bildung von Antikörpern gegen zahlreiche HIV-Proteine (Janeway, C.A. et al. 2002).

1.4 HIV und Apoptose der CD4⁺ T-Lymphozyten

Bei der HIV-Infektion wird die Apoptose als Hauptmechanismus des CD4⁺ T-Zellverlustes angesehen (Groux, H. et al. 1992). Dieses durch das Virus induzierte Helferzellsterben spielt die Schlüsselrolle in der Entwicklung des Immundefektes. HIV infiziert und tötet in erster Linie HIV-antigenspezifische CD4⁺ T-Lymphozyten ab (Douek, D.C. et al. 2002). Allerdings kodiert es auch für proapoptotische Proteine, die sowohl bei infizierten als auch nicht infizierten T-Lymphozyten Apoptose auslösen können. Dazu zählen gp120, gp160, tat, nef, vpr, vpu, vif und die virale Protease. Die tatsächliche Wirkung dieser Proteine ist abhängig vom Zelltyp auf den sie treffen. Sie können je nach Umfeld und Situation sowohl anti- als auch proapoptotisch wirken (Varbanov, M.E. et al. 2006). Das Hüllprotein gp120 löst durch Bindung an CD4⁺ T-Zellen eine FAS/ FAS-Ligand vermittelte Apoptose aus. Infizierte CD4⁺ Helferzellen exprimieren ihrerseits CD178 (FAS-Ligand), der durch Bindung an CD95⁺ T-Zellen deren Apoptose auslösen kann (Zauli, G. et al. 1999). Das HIV-Protein tat reguliert ebenfalls eine FAS/ FAS-Ligand vermittelte Apoptose. Dadurch wird wiederum die Empfindlichkeit der nicht infizierten Zellen gegenüber einer CD95-vermittelten Apoptose erhöht (Westendorp, M.O. et al. 1995). Nef interagiert mit dem Korezeptor CXCR4 und induziert auf diese Weise die Apoptose von CD4⁺ T-Lymphozyten (James, C.O. et al. 2004). Das HIV-Protein vpr bedingt einen starken Abfall des mitochondrialen Membranpotentials mit einer gleichzeitigen Freisetzung von Cytochrom c. Dadurch wird eine mitochondrienvermittelte Apoptose in Gang gesetzt (Deniaud, A. et al. 2004). Tat spaltet Caspase 3, deren Spaltprodukte zur Depolarisierung der Mitochondrienmembran führen, wobei Cytochrom c freigesetzt

und die Apoptose induziert wird (Macho, A. et al. 1999). Ein weiterer Auslöser des intrinsischen Apoptosesignalwegs ist die virale Protease. Sie aktiviert zeitgleich die Procaspase 8 und reguliert Bcl-2 herunter. Die Regulation von Bcl-2 als antiapoptotisches Protein wird ebenfalls durch die Bindung von gp120 an CD4-Rezeptoren der aktivierten T-Lymphozyten gestört (Nie, Z. et al. 2007). Umgekehrt können HIV-Proteine auch antiapoptotisch in die Caspasekaskade einschreiten. Tat kann die Aktivität der Caspase 10 minimieren und zeigt damit einen antiapoptotischen Effekt (Gibellini, D. et al. 2005). Nef vermindert die Expression von MHC-Klasse-1 (*major histocompatibility complex*) Molekülen auf der Zelloberfläche und hemmt somit die Erkennung der infizierten Zellen durch zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten. Außerdem reguliert es den FAS-Liganden CD178 an der Zelloberfläche herauf (Xu, X.N. et al. 1999). Die drei Proteine gp120, nef und vpu schützen ihre Wirtszellen durch die Herunterregulierung des CD4-Oberflächenmoleküls vor CD4-gp120 vermittelter Apoptose (Inoue, M. et al. 1993), (Willey, R.L. et al. 1992), (Cefai, D. et al. 1992), (Cossarizza, A. 2008).

1.5 Fragestellung

Die HIV-Infektion ist durch einen progressiven Verlust an CD4⁺ T-Lymphozyten charakterisiert. Dabei gilt die Apoptose als Hauptmechanismus der CD4⁺ Zelldepletion.

Es gibt jedoch bisher wenig Aufschluss darüber, wie das komplexe System der Apoptose bei HIV-infizierten Personen gesteuert wird. Der mitochondrialen Dysfunktion wird eine Schlüsselfunktion in der Apoptose beigemessen.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, einen Zusammenhang des mitochondrialen Membranpotentials und der Apoptoserate bei HIV-infizierten, antiretroviral untherapierten Patienten heraus zu arbeiten.

Um den Einfluss des HI-Virus und der HIV-Infektion besser abschätzen zu können, wird der Zusammenhang der Apoptoserate und des mitochondrialen Membranpotentials mit HIV-Verlaufsparametern, wie der CD4⁺ Zellzahl, der HI-Viruslast und der Dauer der Infektion dargestellt.

Desweiteren werden, um den Einfluss des HI-Virus und der HIV-Infektion zu beleuchten, HIV-negative Kontrollpersonen zum Vergleich der Ergebnisse herangezogen.

Bislang gibt es keine verlässlichen Methoden, um routinemäßig das Ausmaß der Mitochondrienschädigung oder der Apoptoserate HIV-infizierter Patienten zu beurteilen. Die häufig angewendete Bestimmung des mtDNA-Gehaltes lässt keinen direkten Rückschluss auf die Mitochondrienfunktion zu (Maagaard, A. et al. 2006).

Daher ist das zweite Ziel dieser Arbeit, geeignete Methoden zur Kontrolle dieser Parameter zu erproben.

Mit Hilfe der JC-1 Färbung kann das MMP der PBMC bestimmt werden. Zur Messung der Apoptoserate der PBMC wird die Annexin V-FITC Färbung eingesetzt. Die Isolierung von PBMC aus dem Blut HIV-infizierter Patienten ist im Rahmen der Routineuntersuchung einfach durchzuführen. Somit könnten diese beiden Methoden eine praktikable Möglichkeit zur Abschätzung HIV-induzierter Schädigungen an PBMC und deren Mitochondrien darstellen.

2 Probanden, Material und Methodik

2.1 Probanden

Für die Analyse des Status der peripheren mononukleären Blutzellen wurden im Zeitraum von Juni 2005 bis Oktober 2007 76 Probanden in die Querschnittsuntersuchung eingeschlossen. Nach einem ausführlichen Informationsgespräch erklärten die Probanden ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Untersuchung. Es wurden zwei Gruppen gebildet: HIV-infizierte, bisher nicht antiretroviral therapierte Patienten (Gruppe 1) und gesunde, HIV-negative Probanden als Kontrollgruppe (Gruppe 2). Gruppe 1 wurde aus dem Patientenkollektiv der Infektionsabteilung der Medizinischen Poliklinik der LMU rekrutiert und setzte sich aus 47 Patienten, darunter 7 Frauen und 40 Männer, zusammen. Das Durchschnittsalter betrug 42 ± 12 Jahre, der Zeitraum seit dem ersten positiven HIV-Test (Dauer der Infektion) lag im Mittel bei 42 ± 61 Monaten, die mittlere $CD4^+$ Zellzahl betrug 523 ± 175 Zellen/ μ l Vollblut und der durchschnittliche dekadische Logarithmus der Viruskopien/ml Vollblut betrug $4,3 \pm 0,9$; in absoluten Zahlen 67.523 ± 113.664 Virus-RNA-Kopien/ml. Ausschlusskriterien waren akute Infektionen, AIDS-Symptome, opportunistische Infektionen und eine vorangehende oder aktuelle antiretrovirale Therapie. Gruppe 2 bestand aus 29 HIV-negativen Kontrollpersonen, davon 9 Frauen und 20 Männer. Im Durchschnitt war die Kontrollgruppe 39 ± 13 Jahre alt. Für diese Gruppe wurden akute Infektionen, wie Hepatitiden, HIV-Infektion und Diabetes mellitus ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen beider Gruppen wurden miteinander verglichen.

2.2 Material

Die detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien (Geräte, Verbrauchsmaterialien, Probenmaterial, Reagenzien, Medium und Software) findet sich im Anhang dieser Arbeit (Abschnitt 6).

2.3 Methodik

Nach der körperlichen Untersuchung und ausführlichen Anamnese im Rahmen der Routineuntersuchung wurden von allen Probanden folgende Parameter bestimmt:

Blutbild, Differentialblutbild, Elektrolyte (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Na^+), Blutfette (Cholesterin, Triglyzeride, *Low-Density-Lipoprotein*, *High-Density-Lipoprotein*), Leberenzyme (Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase, γ -Glutamyltransferase, alkalische Phosphatase) und Laktatdehydrogenase, Proteine (Gesamtbilirubin, Kreatinin, C-reaktives Protein), Blutzucker, Harnstoff und Laktat sowie der Hepatitisstatus. Für die Gruppe der HIV-positiven Patienten wurde zusätzlich die HIV-Last am Tag der Untersuchung dokumentiert. Ferner wurden die Zellviabilität der peripheren mononukleären Blutzellen (Abschnitt 2.3.2), das mitochondriale Membranpotential (Abschnitt 2.3.3.1), die Apoptoserate (Abschnitt 2.3.3.2) und der Immunstatus (Abschnitt 2.3.3.3) bestimmt.

2.3.1 Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Vollblut

Die Gewinnung der PBMC erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll. Dies ist eine Polysaccharoselösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Aufgrund der Dichteunterschiede der verschiedenen Blutbestandteile und der Biocoll-Lösung können diese bei einer Zentrifugation in übereinanderliegende Schichten aufgetrennt werden. Erythrozyten und Granulozyten haben eine höhere Dichte als Biocoll, Lymphozyten und Monozyten haben eine geringere, das Plasma und die Thrombozyten haben die geringste Dichte. So wird als unterste Schicht ein Erythrozyten-Granulozyten-Gemisch separiert, darüber liegt die Biocoll-Lösung, darüber wird ein Ring von peripheren mononukleären Blutzellen (Lymphozyten und Monozyten) isoliert und ganz oben befindet sich eine Plasma-Thrombozyten-Schicht (Abbildung 6) (Banas, B. et al. 2004).

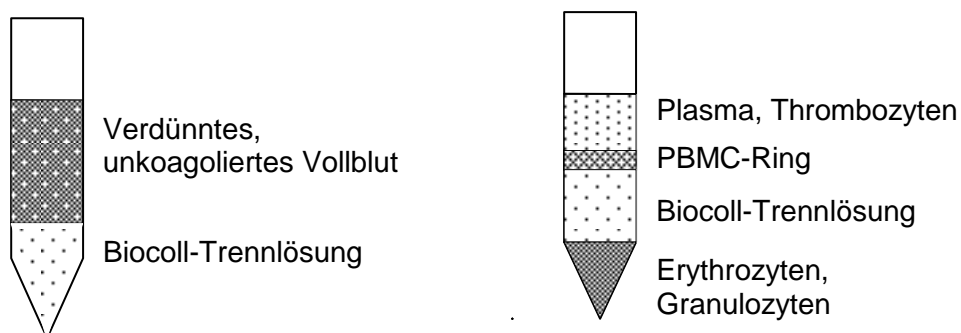


Abbildung 6: Zentrifugenröhrchen vor (links), bzw. nach (rechts) der Dichtegradientenzentrifugation

Durchführung

Als Probenmaterial dienten 9 ml frisches Vollblut, das von jedem Teilnehmer peripher venös in Serum-S-Monovetten entnommen wurde. Das Röhrchen wurde 5 Minuten in Drehung gehalten, dabei begann das Blut zu koagulieren, wobei sich ein Thrombus und eine Phase thrombozytenreduzierten, ungeronnenen Blutes bildeten. Von der flüssigen Phase entnahm man 3 bis 4 ml, gab diese in ein Zentrifugenröhrchen und verdünnte sie mit 6 ml Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (DPBS). Diese Mischung wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen über 4 ml Biocoll-Lösung geschichtet. Es erfolgte eine 20 minütige Dichtegradienten-zentrifugation bei Raumtemperatur und 1500 Umdrehungen/Minute. Die Zentrifuge musste sehr langsam gebremst werden, um die entstandenen Schichten nicht zu verwirbeln. Der separierte PBMC-Ring wurde abpipettiert und zweimal mit 8 ml DPBS gewaschen und nochmals zentrifugiert (5 Minuten, Raumtemperatur, 1500 Umdrehungen/Minute). Das dabei entstandene Zellpellet wurde weiter verwendet, der Überstand verworfen.

2.3.2 Trypanblau-Färbung

Man verwendet die Trypanblau-Färbung, um die Zellvitalität der Probe zu prüfen. Der saure Farbstoff gelangt durch defekte Zellmembranen in das Zytosol, bindet dort an Proteine und färbt tote Zellen tiefblau. Zellmembranen lebender Zellen lassen den Farbstoff nicht penetrieren und bleiben somit ungefärbt. Der Farbstoff wirkt zytotoxisch, lange Einwirkzeiten können zu falsch positiven Ergebnissen führen (Sarkar, S. et al. 2003).

Durchführung

Das gereinigte PBMC-Pellet wurde mit 2,5 ml RPMI 1640 resuspendiert. 10 μl dieser Suspension wurden mit 10 μl Trypanblau-Lösung 0,4 % gemischt und drei Minuten inkubiert. Mit Hilfe der Kova[®]-Zählkammer wurden die lebenden und toten Zellen von 10 μl der obigen Mischung unter dem Mikroskop ausgezählt. Für die weitere Untersuchung wurden Proben mit einem Lebendanteil <90 % ausgeschlossen.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde ein FACScanTM (*fluorescence activated cell sorter*) der Firma Becton Dickinson, Heidelberg verwendet. Bei dieser Methode werden in einem Flüssigkeitsstrom suspendierte, ggf. mit einem Farbstoff markierte Zellen in einem laminaren Strom an einem fokussierten, monochromatischen Lichtstrahl ($\lambda=488\text{ nm}$) vorbeigeführt. Je nach Größe, Granularität und Anfärbung der Zellen kommt es zu einer spezifischen Streuung des Lichtes, bzw. zu einer charakteristischen Emission des Farbstoffes, die mittels geeigneter Photodetektoren gemessen werden. Bei der Streuung des Lichtes unterscheidet man das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*), das in der Richtung des Laserstrahls gebeugt wird und das rechtwinklig gebrochene Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*). Das FSC ist das Maß für die Zellgröße. Das SSC spezifiziert die Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle. Um Fluoreszenzsignale zu erhalten, werden die Zellen mit spezifischen Fluorochromen markiert. Das emittierte Licht wird je nach Spektrum in einen von drei Fluoreszenzkanälen (FL1: 530 nm, FL2: 585 nm, FL3: >650 nm) geleitet und detektiert. Mit dieser Methode können Zellen z. B. durch Ankopplung fluoreszenzmarkierter Antikörper an Oberflächenstrukturen oder direktes Anfärben von Zellbestandteilen charakterisiert und quantifiziert werden. Analysiert wird die Anzahl und Intensität der jeweiligen Ereignisse.

2.3.3.1 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1

Der kationische, lipophile Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) kann in unterschiedlich fluoreszierenden Formen vorliegen. Von gesunden Mitochondrien mit stabil hohem Membranpotential wird er aufgenommen und liegt in der Mitochondrienmatrix als J-Aggregat vor. Nach Anregung mit Licht von 488 nm Wellenlänge (λ) emittieren die Aggregate rotes Licht ($\lambda\sim 585\text{ nm}$), das in Fluoreszenzkanal 2 detektiert wird. Die J-Aggregate sind nicht stabil und zerfallen bei Depolarisation der Mitochondrienmembran in Monomere, die aus dem Organellinneren zurück ins Zytosol diffundieren. Dadurch nimmt die rote Fluoreszenz ab. Die Emission der JC-1 Monomere in hoher Konzentration wird als grüne Fluoreszenz ($\lambda\sim 530\text{ nm}$) in FL1

detektiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale aus FL2 (J-Aggregate) und FL1 (JC-1 Monomere) beschreibt das mitochondriale Membranpotential (Median FL2 / Median FL1). Das Protonophor Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP) ist ein Entkoppler der mitochondrialen Atmung und Phosphorylierung. Inkubiert man Zellen mit FCCP wird der Transport von Protonen in das Mitochondrium erhöht und das mitochondriale Membranpotential bricht zusammen. Die Messung der Fluoreszenzen nach Depolarisierung der Mitochondrienmembran mittels FCCP ergibt eine untersuchungsinterne Basislinie (Positivkontrolle). Es wird sowohl von den unbehandelten Zellen (Median FL2 / Median FL1 (ohne FCCP)) als auch von den mittels FCCP depolarisierten Zellen (Median FL2 / Median FL1 (mit FCCP)) ein Verhältnis der Fluoreszenzsignale der J-Aggregate zu denen der JC-1 Monomere gebildet. Das der mit FCCP versetzten, depolarisierten Zellen wird als 100 % gesetzt. Die Ergebnisse stellen den prozentualen Anteil des Verhältnisses der J-Aggregate zu den JC-1 Monomeren der unbehandelten Zellen zu dem der depolarisierten Zellen dar (Cossarizza, A. et al. 1997), (Sternfeld, T. et al. 2007).

Als Rechenformel für das mitochondriale Membranpotential ergibt sich:

$$MMP = \frac{\text{Median FL2 (ohne FCCP)} / \text{Median FL1 (ohne FCCP)}}{\text{Median FL2 (mit FCCP)} / \text{Median FL1 (mit FCCP)}} * 100 \%$$

Durchführung

JC-1 und FCCP sind stark lichtempfindlich, daher musste zügig und unter Lichtschutz gearbeitet werden. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung. Das, wie in 2.3.1 beschrieben, gewonnene PBMC-Isolat wurde mit supplementiertem RPMI zu einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mit dem Casy[®] 1 TT Zellzähler. 1 ml dieser Suspension wurde mit 5 µl der JC-1 Stocklösung (3,08 µM) versetzt, gemischt und in 2 Falcon[™] Röhrchen à 500 µl geteilt. Die Proben wurden 15 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂-Gehalt im Dunkeln inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur 3 Minuten mit 900 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde zweimal mit 500 µl Dulbecco's PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 400 µl DPBS resuspendiert und durchflusszytometrisch bestimmt. Einer der zwei Proben wurde 60 Sekunden vor der FACS-Messung 16 µl FCCP-Lösung (4 µM) zugesetzt, diese diente als Positivkontrolle.

Auswertung

Die Ereignisse können mit CELLQuest™ in Histogrammen oder Punktwolkendiagrammen („Dot Plots“) dargestellt werden. In einem Histogramm wird auf der x-Achse die Lichtintensität der Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zellen auf der y-Achse aufgetragen. In einem Punktwolkendiagramm erscheint jede Zelle als Punkt. Man kann beliebige Parameter in einem zweidimensionalen x/y Diagramm darstellen. Unterschiedliche Zellpopulationen können in Abhängigkeit von Größe (FSC) und Granularität (SSC) erkannt und durch markieren („gaten“) gesondert ausgewertet werden (Abbildung 7). Für die Auswertung der JC-1 Färbung wurde in dieser Arbeit nur die Population der Lymphozyten der peripheren mononukleären Zellen betrachtet. Es wurden die Ereignisse aus Fluoreszenzkanal 1 (FL1, grüne Fluoreszenz der JC-1 Monomere) auf der x-Achse gegen die aus FL2 (rote Fluoreszenz der J-Aggregate) auf der y-Achse aufgetragen. Gemessen wurde die Probe jeweils mit und ohne Zusatz des Protonophors FCCP (Abbildung 8).

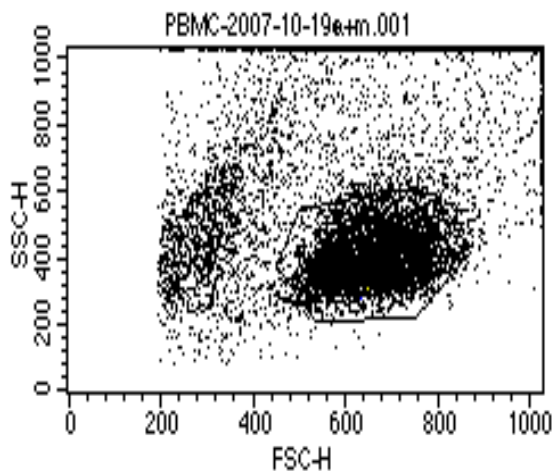


Abbildung 7: Punktwolkendiagramm der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), Auftragung nach Größe (gemessen im Vorwärtsstreulicht (FSC)) und Granularität (gemessen im Seitwärtsstreulicht (SSC)), Gate liegt auf der Lymphozytenpopulation.

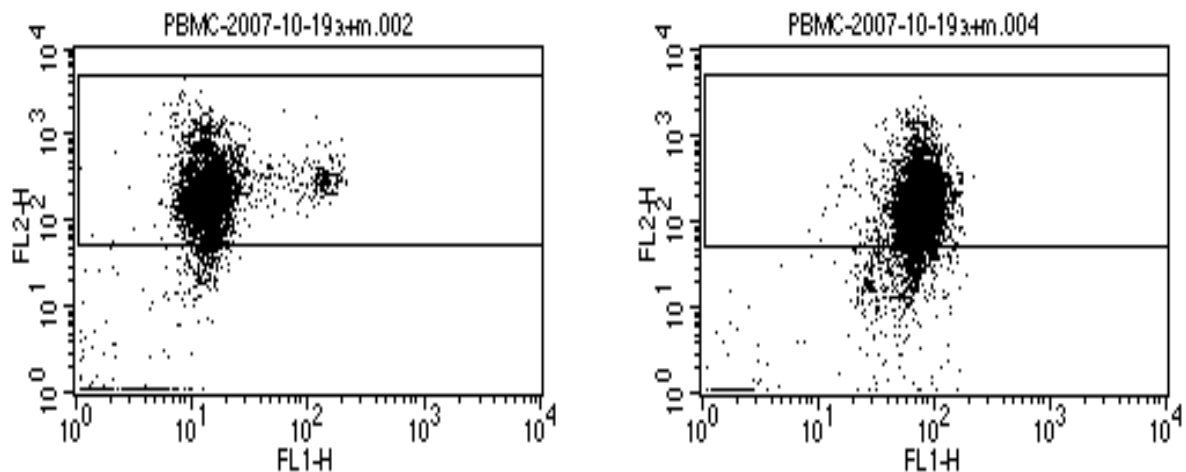


Abbildung 8: Punktwolkendiagramme der Lymphozyten vor (links) und nach (rechts) Depolarisierung durch FCCP-Zugabe, Shift der Ereignisse in Fluoreszenzkanal 1 (FL1) nach rechts (JC-1 Monomere \uparrow) und in FL2 nach unten (J-Aggregate \downarrow).

2.3.3.2 Apoptosemessung mit Hilfe der Annexin V-FITC/ Propidiumiodid

Doppelfärbung

Die Apoptose einer Zelle ist in ihrer Frühphase u. a. durch Verlust der Asymmetrie ihrer Plasmamembran gekennzeichnet. Dadurch kann das Phospholipid Phosphatidylserin (PS), das physiologischerweise auf der Innenseite der Membran lokalisiert ist, auf die Außenseite der Membran umklappen und sich somit der extrazellulären Umgebung präsentieren. Annexin V, ein phospholipidbindendes Protein mit Ca^{2+} -abhängiger, sehr hoher Affinität zu PS, das mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) markiert ist, bindet an PS (Abbildung 9) (Koopman, G. et al. 1994), (Sarkar, S. et al. 2003).

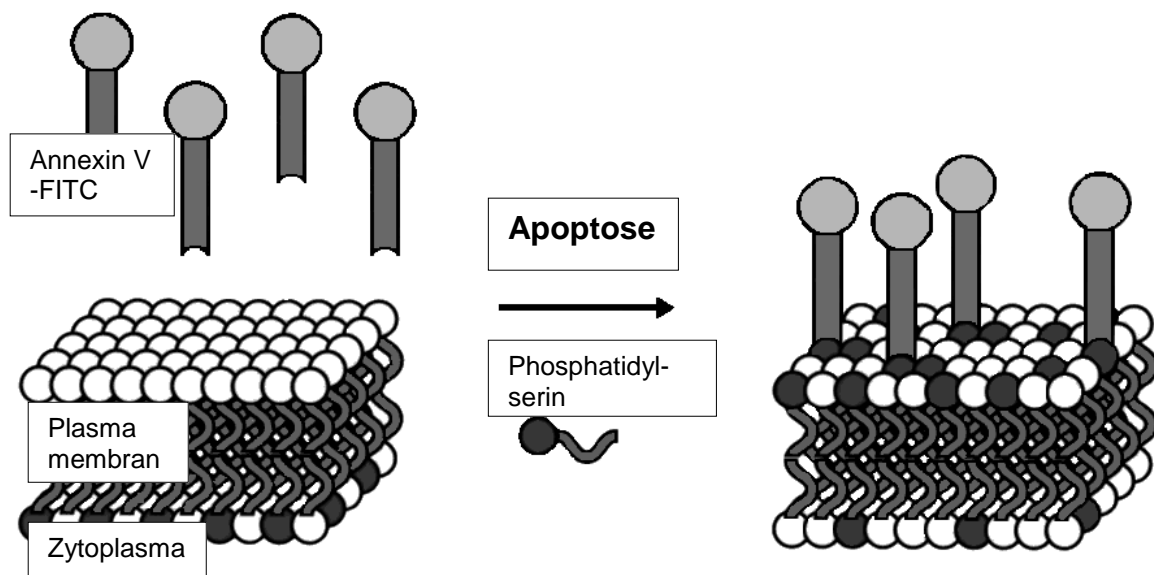


Abbildung 9: Prinzip der Annexin Färbung. Verändert nach (BDBiosciences 2002)

Die Emission des Fluorochroms FITC, mit einer Wellenlänge von ~520 nm, wird in Fluoreszenzkanal 1 detektiert. Der Nachweis des PS mit Annexin V-FITC ist auch bei nekrotischen Zellen positiv. Um diese von den apoptotischen Zellen abzugrenzen, erfolgt eine Doppelfärbung mit Propidiumiodid (PI). PI interkaliert zwischen Basenpaaren doppelsträngiger Nukleinsäuren. So kann es als Marker für nekrotische Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben, genutzt werden. Die Emission von PI wird bei einer Wellenlänge von ~560 nm in FL2 detektiert. Für die FACS-Analyse wird im FSC/SSC die Lymphozyten-Population der PBMC gegatet (Abbildung 10). Trägt man die Annexin V-FITC-positiven Ereignisse auf der x-Achse und die PI-positiven Ereignissen auf der y-Achse auf, erkennt man für diese Zellen im FL1/FL2 Dot Plot drei unterschiedliche Populationen: erstens eine vitale Population, zweitens eine apoptotische Population und drittens eine nekrotische Population (Tabelle 2, Abbildung 11).

Tabelle 2: Zellpopulationen nach Annexin V-FITC/ PI Doppelfärbung im FL1/FL2 Dot Plot

	Annexin V-FITC (FL1)	PI (FL2)
vitale Zellen	negativ	negativ
apoptotische Zellen	positiv	negativ
nekrotische Zellen	positiv	positiv

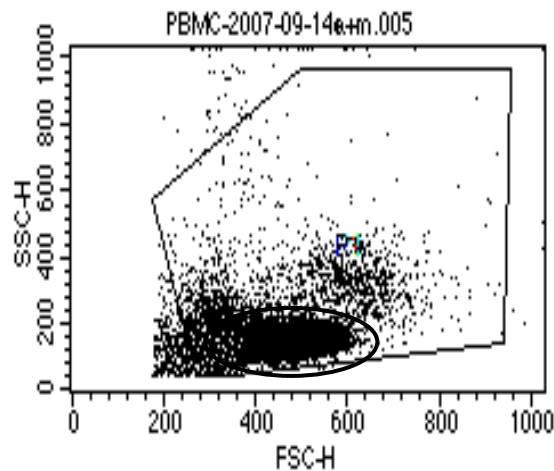


Abbildung 10: Punktwolkendiagramm der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), Auftragung nach Größe (gemessen im Vorwärtsstreulicht (FSC)) und Granularität (gemessen im Seitwärtsstreulicht (SSC)), Region liegt auf PBMC, Gate auf Lymphozyten.

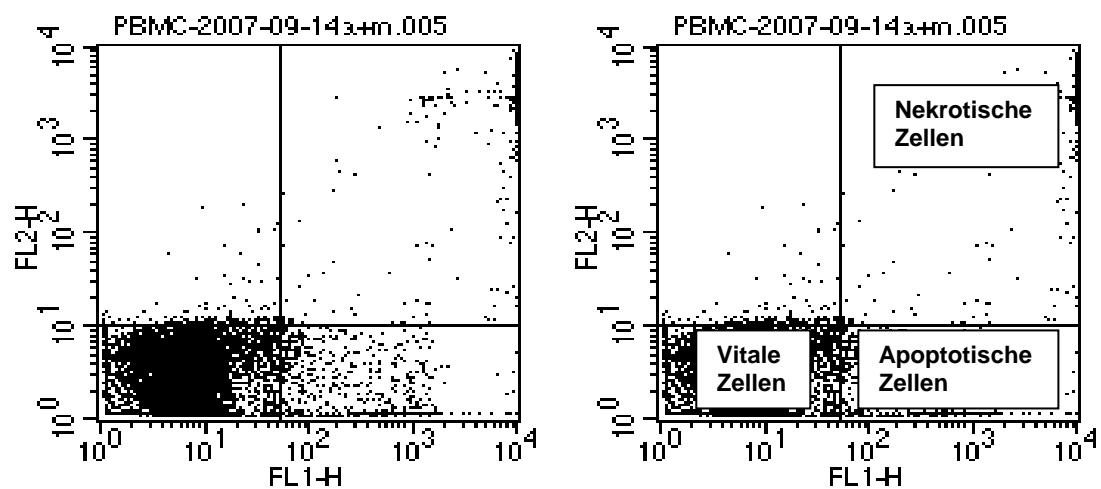


Abbildung 11: Punktwolkendiagramm der Lymphozyten, Auftragung der Ereignisse aus Fluoreszenzkanal 1 (FL1) gegen die Ereignisse aus FL2.

Durchführung

Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung bei 28 (60 %) Patienten der Gruppe 1 und bei allen Probanden der Gruppe 2. Da diese Methode zu einem späteren Zeitpunkt als die Messung des mitochondrialen Membranpotentials etabliert wurde, standen nicht mehr alle Patienten der Gruppe 1 zur Verfügung. Das, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, gewonnene PBMC-Isolat wurde mit Annexin Bindungspuffer (1x) zu einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mit dem Casy® 1 TT Zellzähler. 100 µl dieser Suspension wurden mit 5 µl Annexin V-FITC versetzt, gemischt und 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 5 µl PI-Lösung zugesetzt, gemischt und weitere 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Annexin Bindungspuffer (1x) wurden die Proben durchflusszytometrisch bestimmt.

Auswertung

Mit Hilfe von CELLQuest™ wurden alle Ereignisse in einem FL1/FL2 Punktwolkendiagramm aufgetragen und ausgezählt. Der Anteil der Ereignisse, der apoptotischen Zellen darstellt, Annexin V-FITC positiv (FL1+) und PI negativ (FL2-), wurde prozentual zur Gesamtanzahl der Ereignisse angegeben.

2.3.3.3 Bestimmung der Absolutzahl CD4⁺ T-Lymphozyten

Mittels dem FACS MultiSet™ Systems und den TriTest™-Reagenzien können in einer Blutprobe die Anteile der T-Helferzellen und CD8⁺ T-Zellen detektiert und quantifiziert werden. Es werden jeweils 2 Proben vermessen, Probe 1 mit Zugabe des TriTest™-Reagenz CD3-FITC, CD4-PE, CD45-PerCP (AK 1), Probe 2 mit Zugabe des TriTest™-Reagenz CD3-FITC, CD8-PE, CD45-PerCP (AK 2). Jeder der Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PE) und bindet spezifisch an ein exprimiertes Oberflächenantigen. Humane Lymphozyten können aufgrund ihrer Oberflächenantigen-Expression in unterschiedliche Populationen unterschieden werden. CD45 erkennt ein allgemeines Oberflächenantigen der Leukozyten. Durch Markierung des CD45 Antikörpers (AK) mit dem Fluorochrom Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) kann man im CD45-PerCP/SSC Punktwolkendiagramm die Leukozytenpopulation der Probe erkennen und auf sie gaten, so dass im weiteren Verlauf nur noch diese Zellen analysiert

werden. CD3-FITC identifiziert die Gruppe der T-Lymphozyten, CD4-Phycoerythrin (PE) spezifiziert die der T-Helferzellen und CD8-PE die CD8⁺ T-Zellen. Die Emission der Fluorochrome wird in den drei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen (FITC: FL1, λ ~520 nm; PE: FL2, λ ~580 nm; PerCP: FL3, λ ~670 nm) gemessen. In Probe 1 können somit die prozentualen Anteile der Leukozyten, T-Lymphozyten und T-Helferzellen, in Probe 2 der Anteil der Leukozyten, T-Lymphozyten und CD8⁺ T-Zellen quantifiziert werden. Mit den Angaben der Absolutzahl der Leukozyten aus dem Blutbild und des prozentualen Anteils der Lymphozyten aus dem differenzierten Blutbild, kann MultiSetTM so die Absolutzahlen der T-Helferzellen und CD8⁺ T-Zellen und deren Verhältnis zueinander angeben (Mandy, F.F. et al. 2003), (Nicholson, J.K.A. et al. 1993).

Durchführung

Für die HIV-infizierten, therapie-naiven Patienten (Gruppe 1) erfolgte diese Bestimmung routinemäßig im Labor der Infektionsabteilung der Medizinischen Poliklinik der LMU. Für die Kontrollgruppe (Gruppe 2, HIV-negative Probanden) erfolgte die Analyse der Absolutzahl der CD4⁺ T-Lymphozyten im Rahmen dieser Doktorarbeit. Den Probanden wurde peripher venöses Blut in eine Kalium-EDTA-S-Monovette entnommen. Es wurden zwei Ansätze parallel bearbeitet. Jeweils 50 μ l des antikoagulierten Blutes wurden in ein FalconTM Röhrchen pipettiert. Probe 1 wurde mit 7 μ l TriTestTM-Reagenz (CD3-FITC, CD4-PE, CD45-PerCP) (AK 1) und Probe 2 mit 7 μ l TriTestTM-Reagenz (CD3-FITC, CD8-PE, CD45-PerCP) (AK 2) versetzt, gut gemischt und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Färbung der Leukozyten wurden die in der Probe enthaltenen Erythrozyten durch Zusatz von 500 μ l FACSLyse LösungTM (1x) lysiert. Dafür wurden die Proben weitere 15 Minuten unter Lichtschutz gelagert. Der Überstand wurde bei 1200 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert, das Zellpellet einmal mit 2 ml DPBS gewaschen, wieder abzentrifugiert und durchflusszytometrisch bestimmt.

Auswertung

Die Software MultiSetTM gab nach Eingabe der absoluten Leukozytenzahl und des prozentualen Lymphozytenanteils der einzelnen Proben die Absolutzahlen der CD3⁺CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helferzellen) und der CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten (und deren Verhältnis zueinander (CD4⁺/ CD8⁺ Ratio) an.

2.3.4 Statistische Methoden

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS® Version 15.0 (SPSS GmbH). Für die deskriptive statistische Analyse der Daten wurden das arithmetische Mittel, der Median, das Minimum und Maximum, das 95 % Konfidenzintervall und als Streumaß die Standardabweichung angegeben. Für den Vergleich zweier Gruppen untereinander wurde der Mann-Whitney-U-Test unter zweiseitiger Fragestellung verwendet. Um mehr als zwei Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde der Rangsummentest nach Kruskal und Wallis durchgeführt. Die nichtparametrischen Rangsummentests Mann-Whitney-U und Kruskal-Wallis-H wurden zur statistischen Analyse verwendet, um der unterschiedlichen Größe der Gruppen und der Tatsache, dass die Grundgesamtheiten nicht aller Variablen normalverteilt waren, Rechnung zu tragen. Die nichtparametrische Korrelationsanalyse wurde nach Spearman mit zweiseitiger Fragestellung durchgeführt und ermittelte den Korrelationskoeffizienten r und die Signifikanz p . Zur Gegenüberstellung von Häufigkeiten wurde der Chi-Quadrat Test angewendet. Als statistisch signifikant wurden alle Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p -Wert) kleiner 0,05 akzeptiert.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Charakteristika und klinische Parameter der teilnehmenden Probanden

Demographische Charakteristika

An der Untersuchung nahmen insgesamt 76 Personen in zwei Gruppen teil. Gruppe 1 bestand aus 47 HIV-infizierten, bisher unbehandelten Patienten. 29 HIV-negative Kontrollpersonen stellten die Gruppe 2. Die Geschlechterverteilung unterschied sich mit 40 (85 %) Männern und 7 (15 %) Frauen in Gruppe 1 von der Gruppe 2 mit einer Verteilung von 20 (69 %) Männern zu 9 (31 %) Frauen. Das mediane Alter war mit 41 Jahren in Gruppe 1 und 38 Jahren in Gruppe 2 vergleichbar.

Mitochondriales Membranpotential

Das mediane mitochondriale Membranpotential lag bei den HIV-infizierten Patienten mit 662 % signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe mit 832 % ($p < 0,001$) (Abbildung 12).

Apoptoserate

Die Apoptoserate wurde in der Gruppe 1 für 28 (60 %) der 47 Patienten bestimmt (vgl. Abschnitt 2.3.3.2). Die Mediane der Apoptoserate unterschieden sich signifikant mit 10,6 % in Gruppe 1 zu 6,8 % in Gruppe 2 ($p = 0,001$) (Abbildung 13).

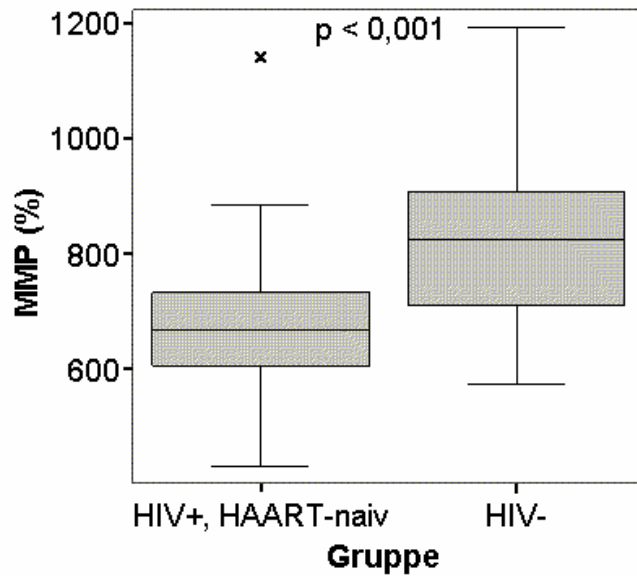


Abbildung 12: Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) zwischen der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (HIV+, HAART-naïv) (n=47) und der der gesunden Probanden (HIV-) (n=29). x: Ausreißer aus dem Interquartilbereich ($Q_{0,75}$ - $Q_{0,25}$); (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit)

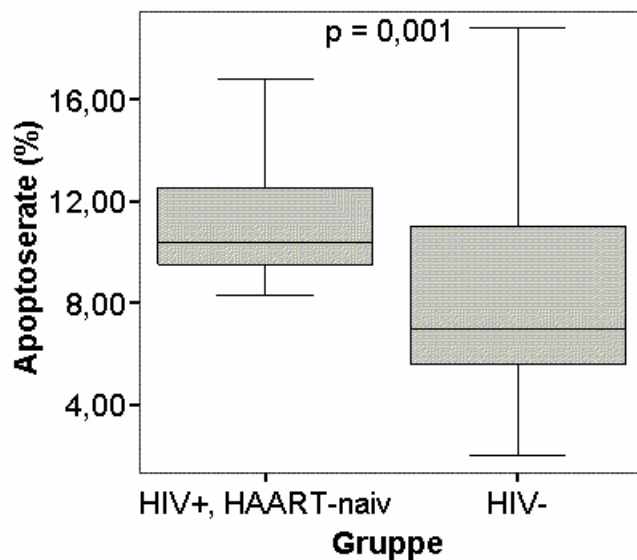


Abbildung 13: Vergleich der Apoptose rate zwischen der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (HIV+, HAART-naïv) (n=28) und der der gesunden Probanden (HIV-) (n=29). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit)

Trypanblaufärbung

Die Trypanblaufärbung wurde eingesetzt, um die isolierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) auf Viabilität zu prüfen. Proben mit einem geringeren Lebendanteil an Zellen als 90 % wären aus der Untersuchung ausgeschlossen worden. Dies war weder bei Gruppe 1 noch bei Gruppe 2 der Fall.

Immunstatus, HI-Viruslast und Infektionsdauer

Der Anteil $CD4^+$ T-Lymphozyten am Tag der Untersuchung lag im Median bei den HIV-infizierten Patienten mit 426 Zellen/ μ l signifikant unter dem der Kontrollgruppe mit 812 Zellen/ μ l ($p < 0,001$) (Abbildung 14). Der niedrigste gemessene $CD4^+$ -Wert ($CD4^+$ Nadir) lag bei der Gruppe der HIV-positiven Patienten im Median bei 368 Zellen/ μ l. Dieser Wert war für die Kontrollgruppe nicht ermittelbar, da nur eine Messung der $CD4^+$ Zellzahl am Tag der Untersuchung stattfand. Das mediane Verhältnis der $CD4^+$ - zu $CD8^+$ T-Lymphozyten ($CD4^+ / CD8^+$ ratio) war bei den HIV-positiven Patienten mit 0,37 signifikant niedriger als 1,85 in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Für Gruppe 1 wurden zusätzlich HI-Viruslast und Infektionsdauer bestimmt. Die mediane HI-Viruslast betrug 21697 Kopien/ μ l, der dekadische Logarithmus der Viruslast (Lg (VL)) war im Median 4,336. Der Median der Infektionsdauer lag bei 28 Monaten. Damit wurde die Zeitspanne zwischen dem ersten positiven HIV-Test und dem Tag der Messung, nicht die tatsächliche Dauer der Infektion seit dem Tag der Ansteckung beschrieben.

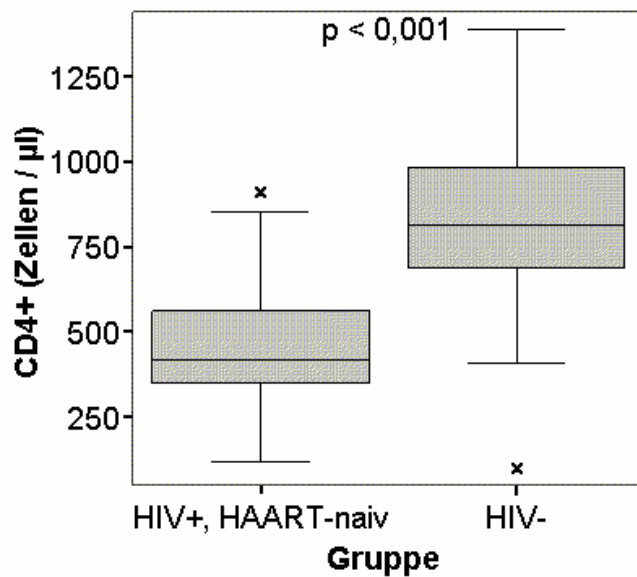


Abbildung 14: Vergleich der CD4+ Zellzahl zwischen der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (HIV+, HAART-naiv) (n=47) und der der gesunden Probanden (HIV-) (n=29). x: Ausreißer aus dem Interquartilbereich (Q0,75-Q0,25); (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit)

Blutbild, Differentialblutbild

Die beiden Gruppen unterscheiden sich im Hinblick auf die zellulären Blutbestandteile nur in der Leukozyten- und in der Lymphozytenzahl. In der Gruppe 1 lag der Median der Leukozytenzahl mit $5,5 \times 10^9$ Zellen/l signifikant unter dem der Kontrollgruppe mit $6,1 \times 10^9$ Zellen/l ($p=0,008$), der mediane Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten war in der Kontrollgruppe mit 35 % signifikant niedriger als der der Gruppe 1 mit 38,5 % ($p=0,012$).

Blutzucker, Harnstoff, Proteine, Laktatwert

Die Blutwerte zeigten nur beim Medianvergleich des C-reaktiven Proteins einen signifikanten Unterschied. Dort lag die HIV-positive Gruppe mit 0,24 mg/dl signifikant über der Kontrollgruppe mit 0,10 mg/dl ($p=0,028$). Die Werte beider Gruppen lagen allerdings im Normbereich ($<0,6$ mg/dl).

Blutfette

Von allen Probanden wurden die Blutfette (Cholesterin, Triglyzeride, Low-Density-Lipoprotein, High-Density-Lipoprotein (HDL)) gemessen und die unterschiedlichen Gruppen anhand der Mediane verglichen. Der mediane Wert des HDL lag bei der HIV-positiven Gruppe mit 35 mg/dl signifikant unter dem der HIV-negativen Gruppe mit 58 mg/dl ($p < 0,001$). Der HDL-Wert der Gruppe 1 unterschritt den Grenzwert von 40 mg/dl. Die anderen Blutfettwerte zeigten keine signifikanten Unterschiede in den beiden Vergleichsgruppen.

Leberenzyme und Laktatdehydrogenase

Bei den gemessenen Enzymen (Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), γ -Glutamyltransferase (GGT), alkalische Phosphatase (AP), Laktatdehydrogenase (LDH)) zeigten sich im Gruppenvergleich signifikante Unterschiede nur bei den Medianvergleichen der ALT-Werte ($p = 0,035$) und LDH-Werte ($p = 0,001$). Allerdings lagen alle Werte im Normbereich ($ALT < 50$ U/l, $LDH < 245$ U/l). Der ALT-Median von Gruppe 1 lag bei 26,0 U/l, der von Gruppe 2 bei 21,0 U/l. Gruppe 1 zeigte einen LDH-Median von 174 U/l, Gruppe 2 von 143 U/l auf.

Elektrolyte

Die Messung der Blutelektrolyte (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Na^+) und der Vergleich der Mediane zeigte, dass sich die beiden Gruppen signifikant im Ca^{2+} - ($p = 0,020$), Cl^- ($p = 0,005$) und K^+ - ($p = 0,041$) Wert unterscheiden, beim Vergleich des Na^+ -Wertes zeigte sich kein Unterschied. Doch alle Werte bewegen sich in der Norm (Ca^{2+} : 2,0–2,8 mmol/l, Cl^- : 95–107 mmol/l, K^+ : 3,5–5 mmol/l). Der Median des Kaliumwertes der Kontrollgruppe liegt bei 3,90 mmol/l, der der Gruppe 1 bei 4,00 mmol/l. Der Median des Chloridwertes liegt bei der Gruppe 2 bei 103 mmol/l, bei Gruppe 1 bei 106 mmol/l. Der Kalziumwert liegt bei der Gruppe der HIV-positiven Patienten im Median mit 2,35 mmol/l über dem der HIV-negativen Probanden mit 2,24 mmol/l.

Hepatitisstatus

In der Kontrollgruppe wurde weder eine Hepatitis B (HBV)- noch eine Hepatitis C (HCV)- Infektion diagnostiziert. In Gruppe 1 der HIV-positiven Probanden wurden 2 positive Hepatitis B- und 5 positive Hepatitis C-Serologien gefunden und als bestehende Infektionen bestätigt. Die Häufigkeitsverteilungen beider Infektionen unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollgruppe (p -Werte=0,001).

Wichtige demographische Charakteristika und klinische Parameter beider Gruppen sind in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt. Dort sind Mittelwert und Median als Lagemaß angegeben, als Streuungsmaße die Standardabweichung und die Spannweite mit Minimum und Maximum und das 95 %-Konfidenzintervall, das den Unsicherheitsbereich des errechneten Mittelwertes anzeigt.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der demographischen Charakteristika und klinischen Parameter der untersuchten Gruppen

	HIV-positiv, HAART-naiv n=47 (62 %)	HIV-negativ n=29 (38 %)	p-Wert
Geschlecht (Anzahl)			0,001(s) ^a
Weiblich	7 (15 %)	9 (31 %)	
Männlich	40 (85 %)	20 (69 %)	
Alter (Jahre)			0,054 (ns) ^b
Mittelwert	41,5	39,2	
Standardabweichung	12,1	12,7	
95 % Konfidenzintervall	34,2–48,8	33,9–44,4	
Median	41,0	38,0	
Min–Max	21-62	21-67	
Mitochondriales Membranpotential (%)			<0,001 (s) ^b
Mittelwert	684,3	827,9	
Standardabweichung	172,1	183,6	
95 % Konfidenzintervall	580,3–788,3	752,2–903,8	
Median	662,0	832,0	
Min–Max	432–1140	575-1192	
Apoptoserate (%)	(n=28 (49 %))	(n=29 (51 %))	0,001 (s) ^b
Mittelwert	11,7	8,32	
Standardabweichung	2,7	4,25	
95 % Konfidenzintervall	10,1–13,4	6,90–10,41	
Median	10,6	6,8	
Min–Max	8,3–16,8	2,0–18,8	

	HIV-positiv, HAART-naiv n=47 (62 %)	HIV-negativ n=29 (38 %)	p-Wert
CD4⁺ (Zellen/μl)			<0,001 (s)^b
Mittelwert	523	836	
Standardabweichung	175,4	300,8	
95 % Konfidenzintervall	417–629	712–960	
Median	426	812	
Min–Max	346-910	100-1088	
CD4⁺ Nadir (Zellen/μl)			
Mittelwert	392	n. z.	
Standardabweichung	158,7	n. z.	
95 % Konfidenzintervall	296–487	n. z.	
Median	368	n. z.	
Min–Max	178-654	n. z.	
CD4⁺/ CD8⁺ Ratio			<0,001 (s)^b
Mittelwert	0,41	1,99	
Standardabweichung	0,19	1,11	
95 % Konfidenzintervall	0,30–0,53	1,54–2,45	
Median	0,37	1,85	
Min–Max	0,21–0,89	0,20–6,16	
Infektionsdauer (Monate)			
Mittelwert	42	n. z.	
Standardabweichung	61	n. z.	
95 % Konfidenzintervall	5–79	n. z.	
Median	28	n. z.	
Min–Max	1-231	n. z.	
HI-Viruslast (VL)(Kopien/ml)			
Mittelwert	67.523	n. z.	
Standardabweichung	113.664	n. z.	
95 % Konfidenzintervall	34.150–100.896	n. z.	
Median	21.697	n. z.	
Min–Max	117–500.000	n. z.	
Lg (VL)			
Mittelwert	4,255	n. z.	
Standardabweichung	0,880	n. z.	
95 % Konfidenzintervall	3,997–4,514	n. z.	
Median	4,336	n. z.	
Min–Max	2,07–5,70	n. z.	

	HIV-positiv, HAART-naiv n=47 (62 %)	HIV-negativ n=29 (38 %)	p-Wert
Leukozyten (x10⁹ Zellen/l)			<0,001 (s)^b
Mittelwert	5,6	6,7	
Standardabweichung	1,48	1,54	
95 % Konfidenzintervall	5,08–6,11	7,45–9,57	
Median	5,5	6,1	
Min–Max	2,7–9,7	4,9–10,3	
Lymphozyten (%)			0,012 (s)^b
Mittelwert	40,6	34,0	
Standardabweichung	10,15	11,06	
95 % Konfidenzintervall	37,07–44,01	28,62–39,2	
Median	38,5	35,0	
Min–Max	20–59	12–54	
CRP (mg/dl)			0,028 (s)^b
Mittelwert	0,492	0,642	
Standardabweichung	1,111	1,455	
95 % Konfidenzintervall	0,078–0,907	0,059–1,343	
Median	0,240	0,100	
Min/Max	0,05–6,20	0,01–4,88	
HDL (mg/dl)			<0,001 (s)^b
Mittelwert	36,7	60,9	
Standardabweichung	12,96	16,10	
95 % Konfidenzintervall	31,8–41,5	53,0–68,6	
Median	35,0	58,0	
Min–Max	14–71	32–98	
ALT (U/l)			0,035 (s)^b
Mittelwert	47,7	25,7	
Standardabweichung	47,22	16,65	
95 % Konfidenzintervall	30,0–65,3	17,7–33,7	
Median	26,0	21,0	
Min – Max	5–239	8–65	
LDH (U/l)			0,001 (s)^b
Mittelwert	183,9	146,2	
Standardabweichung	48,67	32,23	
95 % Konfidenzintervall	165,7–202	130,1–161,7	
Median	174	143	
Min – Max	118–314	80–208	

	HIV-positiv, HAART-naiv n=47 (62 %)	HIV-negativ n=29 (38 %)	p-Wert
Ca²⁺ (mmol/l)			0,020 (s)^b
Mittelwert	2,33	2,22	
Standardabweichung	0,158	0,173	
95 % Konfidenzintervall	2,281–2,382	2,133–2,312	
Median	2,35	2,24	
Min–Max	2,00–2,61	2,0–2,49	
Cl⁻ (mmol/l)			0,005 (s)^b
Mittelwert	106,2	103,95	
Standardabweichung	3,658	5,064	
95 % Konfidenzintervall	105,01–107,34	101,7–106,3	
Median	106,0	103	
Min–Max	98–117	98–112	
K⁺ (mmol/l)			0,041 (s)^b
Mittelwert	4,03	3,86	
Standardabweichung	0,327	0,237	
95 % Konfidenzintervall	3,931–4,127	3,758–3,963	
Median	4,0	3,90	
Min–Max	3,3–5,0	3,5 – 4,4	
Hepatitisserologie (Anzahl)			
HBV	2 (4 %)	0 (0 %)	0,001 (s)^a
HCV	5 (11 %)	0 (0 %)	0,001 (s)^a

a Chi-Quadrat Test

b Medianvergleich mittels Mann-Whitney-U-Test

ns: nicht signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen

n. z.: nicht zutreffend

s: signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen

3.2 Mitochondriales Membranpotential und Apoptoserate

Die graphische Darstellung der Apoptoserate gegen das mitochondriale Membranpotential zeigte eine signifikante, negative Korrelation zwischen diesen beiden Parametern sowohl bei der Gruppe der HIV-infizierten Patienten (Abbildung 15) als auch bei der Kontrollgruppe (Abbildung 16). Bei den Korrelationsanalysen nach Spearman ergab sich für Gruppe 1 eine hohe, signifikante, negative Korrelation ($p < 0,001$) mit einem Korrelationskoeffizient (r) von -0,736. Auch in Kontrollgruppe 2 korrelierten diese beiden Parameter signifikant ($r = -0,635$, $p < 0,001$).

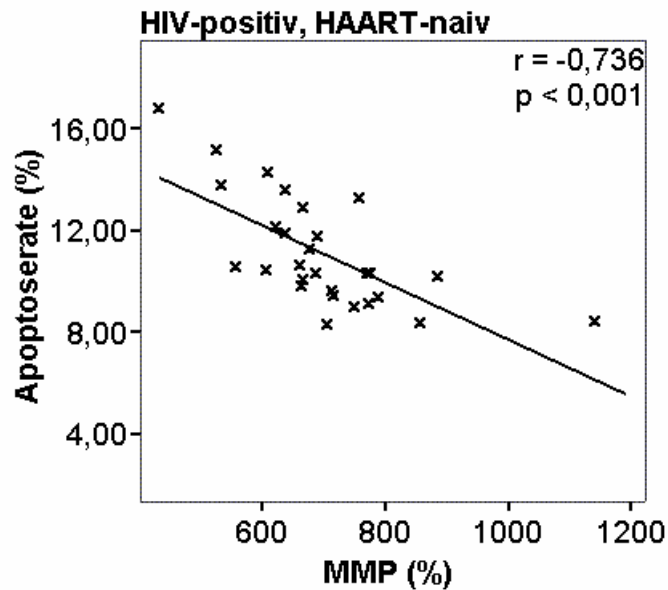


Abbildung 15: Korrelation zwischen dem mitochondrialen Membranpotential (MMP) und Apoptoserate in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=28). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

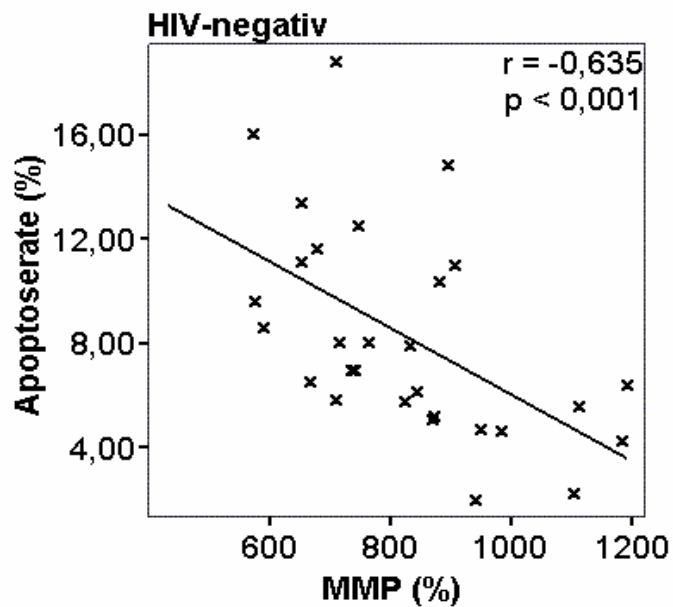


Abbildung 16: Korrelation zwischen dem mitochondrialen Membranpotential (MMP) und Apoptoserate in der Gruppe der gesunden Probanden (n=29). (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

3.3 Immunstatus und Mitochondrienfunktion

Gruppe 1: HIV-infizierte, therapienaive Probanden

In der Gruppe der HIV-positiven Patienten konnten signifikante Korrelationen zwischen dem jeweils niedrigsten gemessenen $CD4^+$ Wert ($CD4^+$ Nadir) ($r=0,523$, $p<0,001$) (Abbildung 17) bzw. der $CD4^+$ -Zellzahl am Tag der Untersuchung ($CD4^+$) ($r=0,389$, $p<0,001$) und dem mitochondrialen Membranpotential (Abbildung 18) gezeigt werden. Die Korrelationen zwischen dem mitochondrialen Membranpotential und dem Verhältnis der $CD4^+$ -Zellzahl zur $CD8^+$ -Zellzahl ($CD4^+/CD8^+$ Ratio) fiel schwächer, aber auch signifikant aus ($r=0,327$, $p=0,025$).

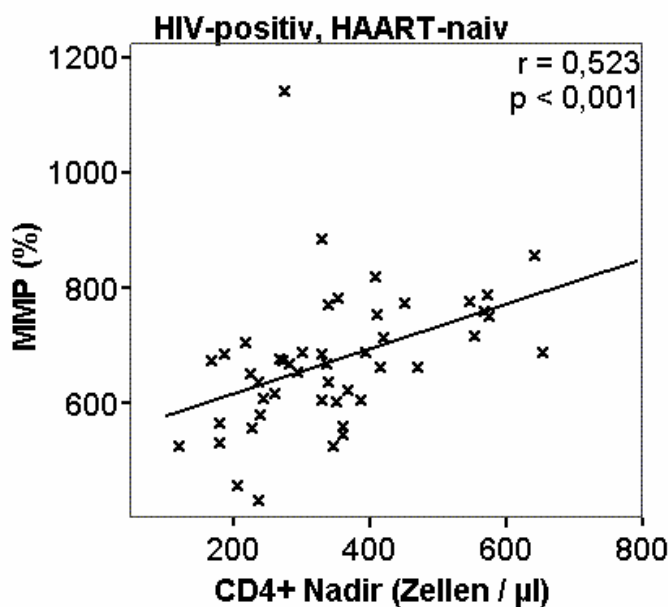


Abbildung 17: Korrelation zwischen dem $CD4^+$ Nadir-Wert und dem mitochondrialen Membranpotential (MMP) in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten ($n=47$). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p : Irrtumswahrscheinlichkeit); (r : Korrelationskoeffizient)

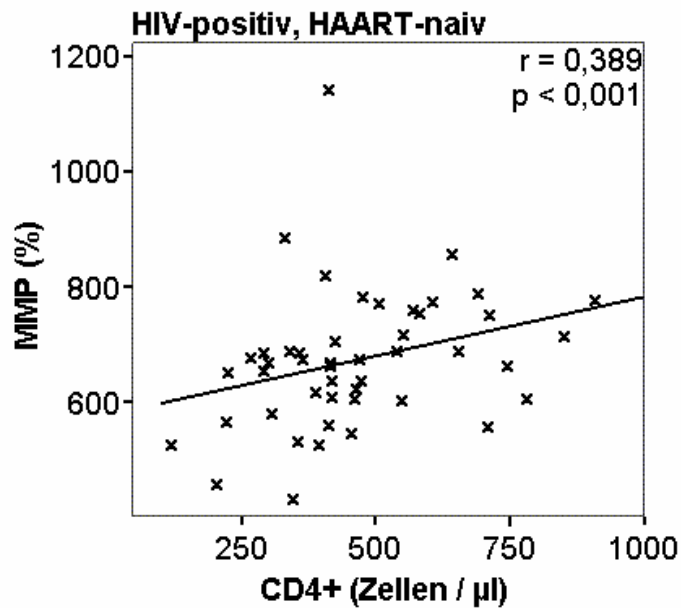


Abbildung 18: Korrelation zwischen dem CD4⁺-Wert am Tag der Untersuchung und dem mitochondrialen Membranpotential (MMP) in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=47). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

Es bestand eine signifikante, negative Korrelation zwischen dem CD4⁺ Nadir-Wert und der Apoptoserate ($r=-0,397$, $p=0,037$) (Abbildung 19) bzw. dem aktuellen CD4⁺-Wert (Zellen/µl) und der Apoptoserate ($r= 0,419$, $p=0,027$) (Abbildung 20) in der Gruppe 1. Zwischen der Apoptoserate und dem CD4⁺/ CD8⁺ Ratio konnte eine geringe, signifikante Korrelation gezeigt werden ($r=0,203$, $p=0,3$).

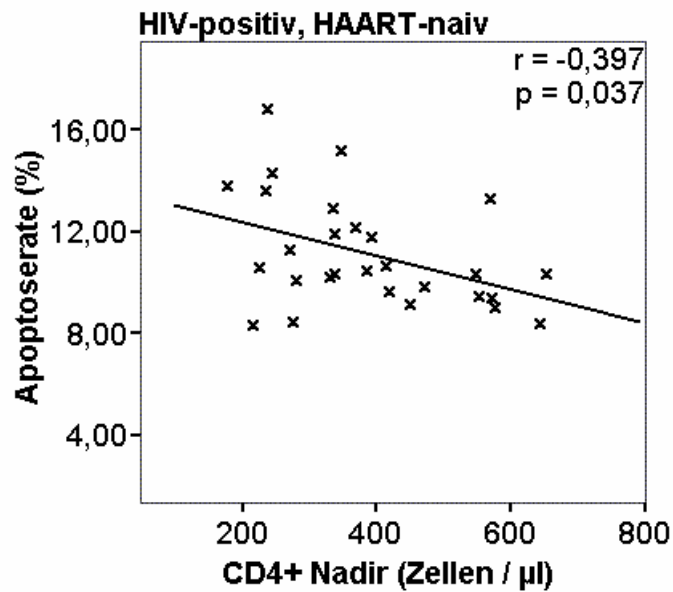


Abbildung 19: Korrelation zwischen dem CD4⁺ Nadir-Wert und der Apoptoserate in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=28). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

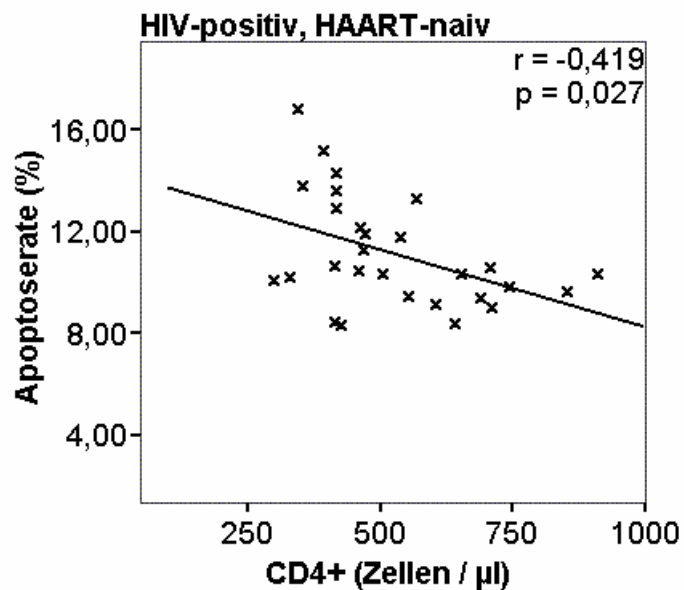


Abbildung 20: Korrelation zwischen dem CD4⁺-Wert am Tag der Untersuchung und der Apoptoserate in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=28). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

Unterteilt man die Gruppe der HIV-infizierten Patienten, gestaffelt nach CD4⁺ Nadir-Werten in drei neue Untergruppen, ergeben sich neue Mediane. Für Gruppe A, mit CD4⁺ Nadir-Werten <200 Zellen/μl liegt der Median des mitochondrialen Membranpotentials bei 564% (n=5), der der Apoptoserate ist statistisch nicht errechenbar, da diese Gruppe nur aus einem Probanden besteht. Gruppe B hat CD4⁺ Nadir-Werte von 200-500 Zellen μl. Hier findet sich der MMP-Median bei 661 % (n=35), der Median der Apoptoserate bei 10,6 % (n=20). In der Gruppe C, mit CD4⁺ Nadir-Werten >500 Zellen/μl erhöht sich der Median des MMP auf 758 % (n=7); der der Apoptoserate verringert sich auf 9,4 % (n=7). Der Anstieg des Membranpotentials mit Anstieg der CD4⁺-Zellzahl ist statistisch signifikant (p=0,005, n=47) (Abbildung 21). Die Unterschiede der Apoptoserate bei unterschiedlichen CD4⁺-Zellzahlen sind nicht signifikant (p=0,121, n=27) (Abbildung 22).

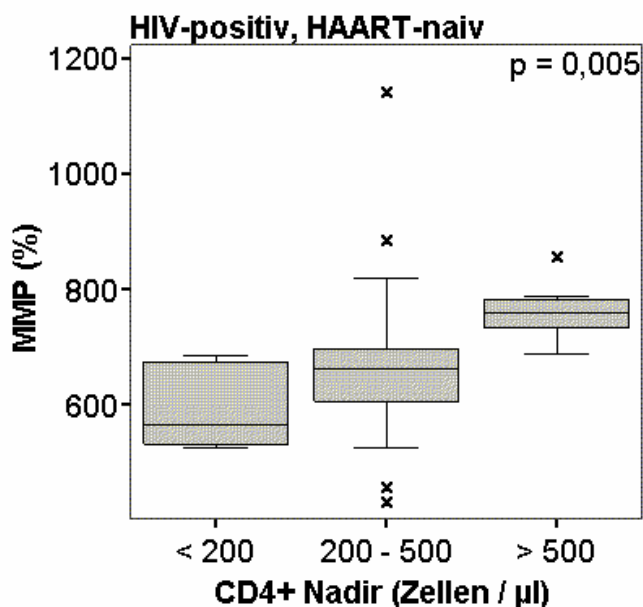


Abbildung 21: Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) in Bezug auf die Höhe des CD4⁺ Nadir-Wertes bei der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.

x: Ausreißer aus dem Interquartilbereich (Q0,75-Q0,25); (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit)

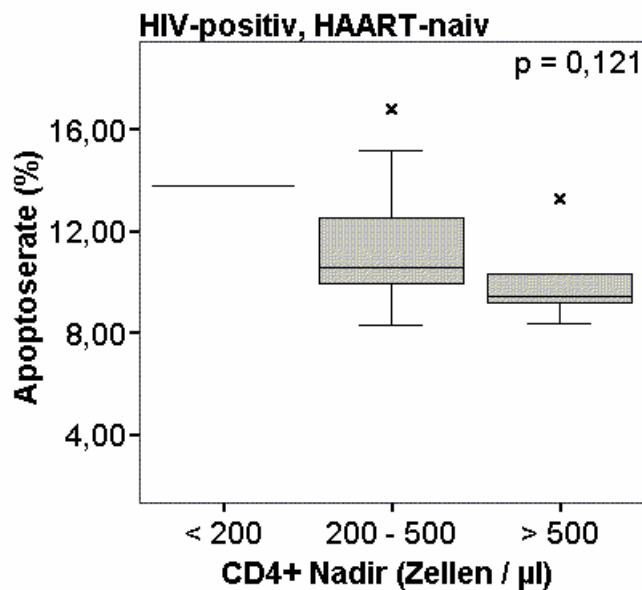


Abbildung 22: Vergleich der Apoptoserate in Bezug auf die Höhe des CD4⁺ Nadir-Wertes bei der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten. x: Ausreißer aus dem Interquartilbereich (Q0,75-Q0,25); (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit)

Gruppe 2: HIV-negative Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe korrelierten das mitochondriale Membranpotential ($r=0,293$, $p=0,155$), bzw. die Apoptoserate ($r=0,239$, $p=0,251$) und die gemessene CD4⁺-Zellzahl nicht signifikant. Zwischen dem MMP ($r=0,062$, $p=0,767$) bzw. der Apoptoserate ($r=0,007$, $p=0,972$) und dem CD4⁺/ CD8⁺ Ratio konnte keine signifikante Korrelation gezeigt werden. Teilt man die Gruppe der HIV-negativen Probanden in drei Untergruppen, gestaffelt nach CD4⁺-Zellzahl ein, so ist in Gruppe A (<200 Zellen/µl) und in Gruppe B (200–500 Zellen/µl) jeweils nur ein Proband, in Gruppe C (>500 Zellen/µl) sind 25 Probanden. Auswertungen der Unterschiede in mitochondrialem Membranpotential und Apoptoserate sind aufgrund der Probandenverteilung statistisch nicht möglich.

3.4 Viruslast und Mitochondrienfunktion

Für die Gruppe der HIV-infizierten Probanden (Gruppe 1) wurden das MMP und die Viruslast (im dekadischen Logarithmus (lg (VL)) gegenübergestellt. Es zeigte sich eine geringe, signifikante, negative Korrelation ($r=-0,303$, $p=0,038$) (Abbildung 23).

Die Apoptoserate und die Viruslast korrelierten nicht signifikant miteinander ($r=0,330$, $p=0,086$).

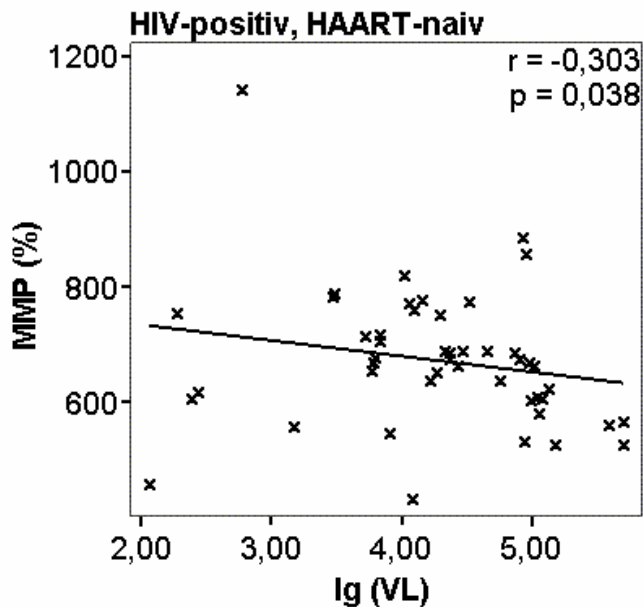


Abbildung 23: Korrelation zwischen der HI-Viruslast (im dekadischen Logarithmus dargestellt (lg (VL)) und dem mitochondrialen Membranpotential (MMP) in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=47). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

3.5 Infektionsdauer und Mitochondrienfunktion

3.5.1 Patienten mit progredientem Infektionsverlauf

Die Auftragung der Infektionsdauer der HIV-positiven Patienten gegen die Apoptoserate zeigte keinen signifikanten Zusammenhang ($r=-0,280$, $p=0,148$) (n=28) (Abbildung 24). Betrachtete man die Gruppe der HIV-infizierten mit einer Infektionsdauer unter 100 Monaten isoliert, ließ also die Langzeitinfizierten (Infektionsdauer >100 Monate) außen vor, so ergab sich eine signifikante Korrelation mit $r=0,413$ und $p=0,036$ (n=26) (Abbildung 25).

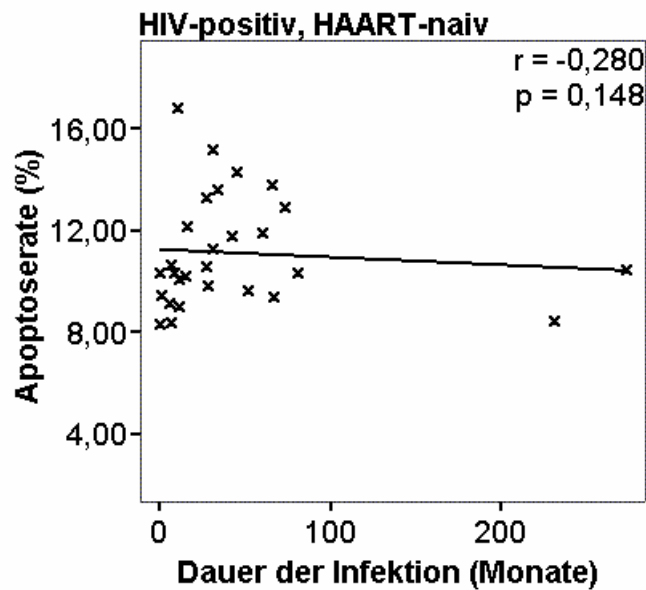


Abbildung 24: Korrelation zwischen Infektionsdauer und Apoptoserate in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=28). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

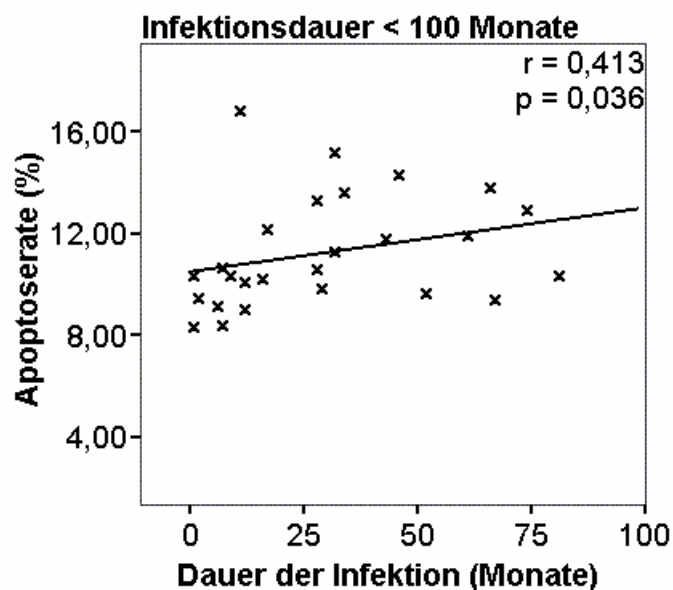


Abbildung 25: Korrelation zwischen Infektionsdauer und Apoptoserate bei kürzer als 100 Monate HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=26). (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

Das mitochondriale Membranpotential zeigte in der Gruppe der HIV-positiven Probanden auch keinen signifikanten Zusammenhang mit der Dauer der Infektion

($r=0,108$, $p=0,471$) ($n=47$) (Abbildung 26). Doch man erkannte, wie bei der Betrachtung der Apoptoserate, eine signifikante, negative Korrelation, wenn man die Probanden mit einer Infektionsdauer unter 100 Monaten isoliert betrachtete ($r=-0,450$, $p=0,010$) ($n=43$) (Abbildung 27).

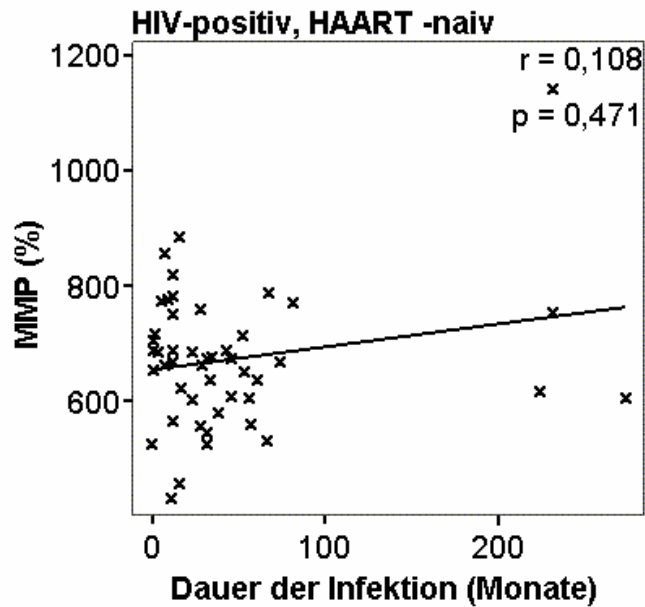


Abbildung 26: Korrelation zwischen Infektionsdauer und mitochondrialem Membranpotential (MMP) in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten ($n=47$). (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p : Irrtumswahrscheinlichkeit); (r : Korrelationskoeffizient)

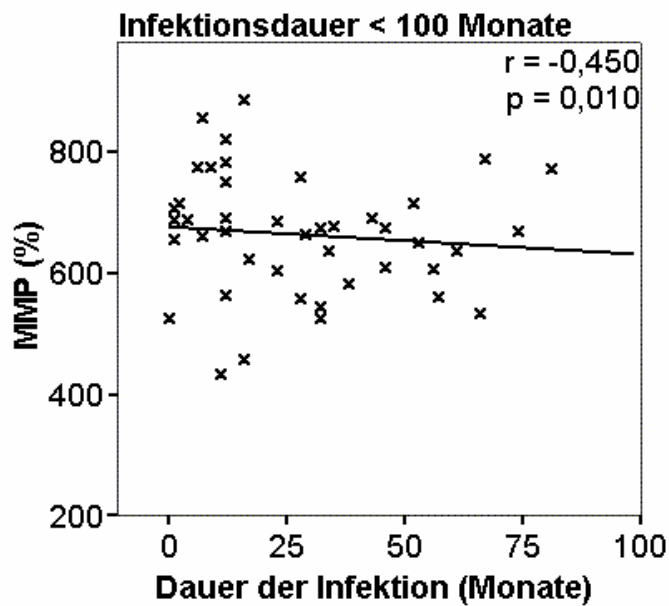


Abbildung 27: Korrelation zwischen Infektionsdauer und mitochondrialem Membranpotential (MMP) bei kürzer als 100 Monate HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=43). (p: Irrtumswahrscheinlichkeit); (r: Korrelationskoeffizient)

3.5.2 Long term non progressors

Der Vergleich verschiedener Parameter zwischen der Gruppe der LTNP (Infektionsdauer >100 Monate, n=4) und der Gruppe der Patienten, die kürzer als 100 Monate HIV-infiziert (n=43) waren, zeigte einen signifikanten Unterschied des Medians der HI-Viruslast (im dekadischen Logarithmus dargestellt (Lg (VL))). Der Median der Gruppe der kürzer als 100 Monate HIV-infizierten Patienten lag mit einem Lg (VL) von 4,375 signifikant über dem der Gruppe der länger als 100 Monaten HIV-infizierten Patienten mit einem Lg (VL) von 2,410 ($p < 0,001$) (Abbildung 28).

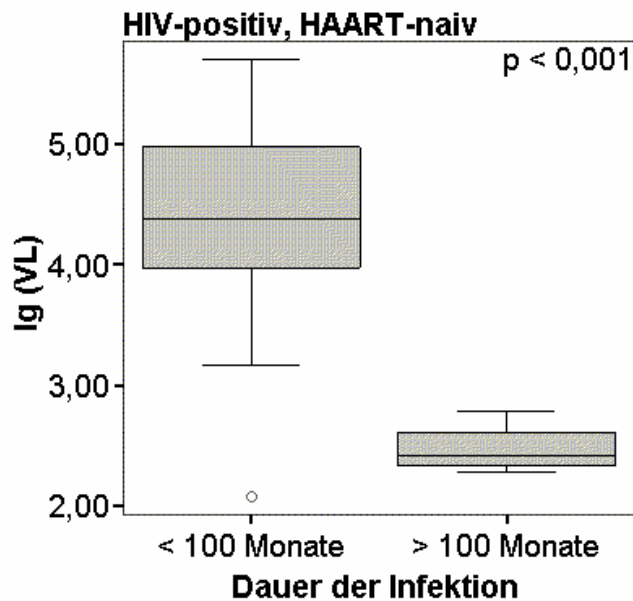


Abbildung 28: Vergleich der logarithmisch dargestellten HIV-Last (lg (VL)) bei HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten mit einer Infektionsdauer kürzer, bzw. länger als 100 Monate;

o: Ausreißer aus dem Interquartilbereich ($Q_{0,75}$ - $Q_{0,25}$); (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit)

Bei den Medianvergleichen von aktueller $CD4^+$ -Zellzahl ($p=0,894$) bzw. dem $CD4^+$ Nadir-Wert ($p=0,879$) und der Infektionsdauer von weniger bzw. mehr als 100 Monaten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Das mediane mitochondriale Membranpotential dieser beiden Teilgruppen unterschied sich ebenfalls nicht signifikant ($p=0,567$). Bei der Gruppe der seit mehr als 100 Monate HIV-infizierten Patienten konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Infektionsdauer und dem MMP gezeigt werden ($p=0,684$, $r=0,316$). Auswertungen für die Apoptoserate waren aufgrund der geringen Fallzahl ($n=2$) statistisch nicht möglich.

3.6 Geschlecht und Mitochondrienfunktion

Verglich man die Mediane der Mitochondrienfunktionen der beiden Gruppen für Frauen und Männer getrennt, so sah man, dass diese sich meist signifikant unterschieden. Bei den Frauen erkannte man einen signifikanten Unterschied des mitochondrialen Membranpotentials ($p=0,030$, (HIV+)=676 %, n (HIV+)=7, (HIV-)=826

%, $n(\text{HIV-})=9$) (Abbildung 29), jedoch keinen beim Vergleich der Apoptoserate ($p=0,053$, $(\text{HIV+})=9,8\%$, $n(\text{HIV+})=5$, $(\text{HIV-})=6,9\%$, $n(\text{HIV-})=9$).

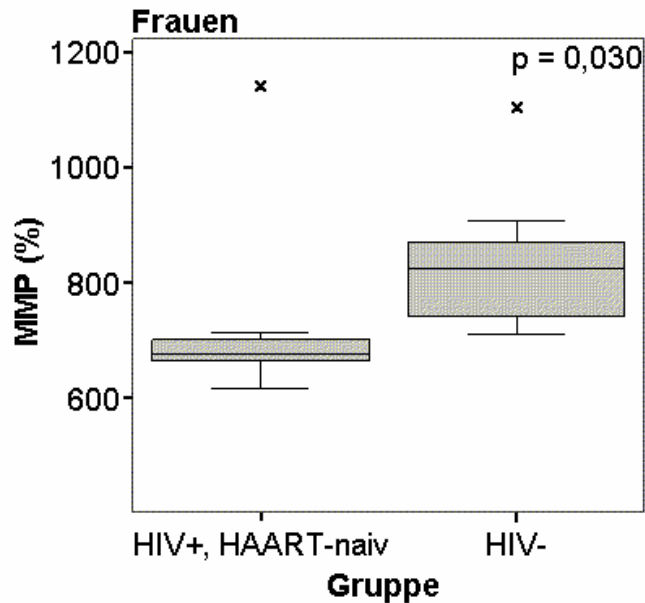


Abbildung 29: Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) zwischen den Frauen der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und denen der Gruppe der gesunden Probanden, **x**: Ausreißer aus dem Interquartilbereich ($Q_{0,75}-Q_{0,25}$); (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p : Irrtumswahrscheinlichkeit)

Bei den Männern sah man sowohl signifikante Unterschiede beim Vergleich des MMP beider Gruppen (HIV-positiv und HIV-negativ) ($p=0,003$, $(\text{HIV+})=664\%$, $n(\text{HIV+})=40$, $(\text{HIV-})=796\%$, $n(\text{HIV-})=20$) (Abbildung 30), als auch beim Vergleich der Apoptoserate ($p=0,011$, $(\text{HIV+})=10,4\%$, $n(\text{HIV+})=23$, $(\text{HIV-})=7,5\%$, $n(\text{HIV-})=20$) (Abbildung 31).

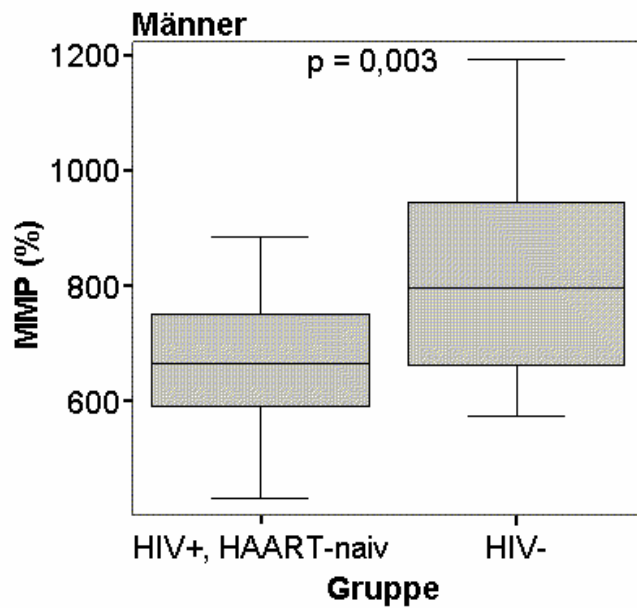


Abbildung 30: Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) zwischen den Männern der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und denen der Gruppe der gesunden Probanden, x: Ausreißer aus dem Interquartilbereich ($Q_{0,75}$ - $Q_{0,25}$); (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit)

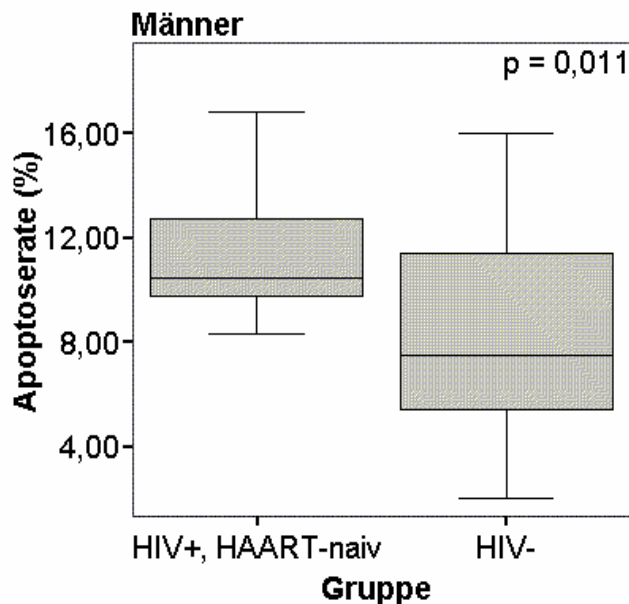


Abbildung 31: Vergleich der Apoptoserate zwischen den Männern der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und denen der Gruppe der gesunden Probanden, x: Ausreißer aus dem Interquartilbereich ($Q_{0,75}$ - $Q_{0,25}$); (HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie); (p: Irrtumswahrscheinlichkeit)

Vergleicht man die Apoptoserate und das MMP der zwei Geschlechter innerhalb der einzelnen Gruppen, so findet man in Gruppe 1 keine signifikanten Unterschiede bei der Betrachtung des MMPs ($p=0,354$) und der Apoptoserate ($p=0,521$) zwischen den Geschlechtern.

In der Kontrollgruppe der nicht HIV-Infizierten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern gezeigt werden, weder bei dem MMP ($p=0,635$) noch bei der Apoptoserate ($p=0,660$).

3.7 Hepatitis und Mitochondrienfunktion

Innerhalb der HIV-infizierten Gruppe waren sieben Probanden mit einer positiven Hepatitisserologie. Der Vergleich der medianen Werte des mitochondrialen Membranpotentials und der Apoptoserate ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen rein HIV-infizierten und Hepatitis-Koinfizierten, weder bei der Betrachtung aller Hepatitis-Koinfizierten (MMP: $p=0,563$, Apoptoserate: $p=0,190$, $n=7$), noch bei der isolierten Betrachtung der HCV-Koinfizierten (MMP: $p=0,159$, Apoptoserate: $p=0,086$, $n=5$). Die HIV-/ HBV koinfizierten Patienten konnten statistisch nicht untersucht werden, da es sich hierbei nur um zwei Personen handelte.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Apoptoserate und das mitochondriale Membranpotential peripherer mononukleärer Blutzellen HIV-infizierter, bisher nicht antiretroviral behandelter Patienten und HIV-negativer Probanden gemessen und verglichen. Die Methoden zur Bestimmung der Apoptoserate (Annexin V-Färbung) und des MMP (JC-1 Protokoll) sind kostengünstig, gering invasiv und klinisch relativ einfach durchzuführen. Sie könnten zur Früherkennung von Schädigungen durch HIV-induzierte Apoptose oder verminderte Mitochondrienfunktion herangezogen werden. Eine Erweiterung der Messung von HIV-Verlaufsparemtern um einen Apoptosemarker könnte zu einem optimierten Management HIV-bedingter Komplikationen führen und zu einer verlässlichen Bewertung individueller Patientenrisiken beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Apoptoserate und MMP, bzw. den HIV-Verlaufsparemtern wie Immunstatus oder Viruslast darzustellen.

4.1 HIV und Apoptoserate beziehungsweise mitochondriales Membranpotential

4.1.1 HIV-Infektion und Apoptoserate

Die Messung der Apoptoserate mittels der Annexin V-FITC Färbung zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe 1 der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten (n=28) und der der HIV-negativen Kontrollgruppe 2 (n=29). Mit 10,6 % apoptotischen, peripheren mononukleären Blutzellen zeigte die Gruppe 1 eine erhöhte Schädigung der PBMC gegenüber der Gruppe 2 mit 6,8 % (Abbildung 13).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten mit derselben Methode eine erhöhte Apoptoserate bei HIV-infizierten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden belegen (Losa, G.A. et al. 2000). Herbeuval et al. (2005) zeigten eine signifikant erhöhte Apoptoserate von CD4⁺ T-Lymphozyten HIV-infizierter Patienten im Vergleich zu denen HIV-negativer Probanden. Durch Blockierung des TRAIL (*tumor*

necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-Rezeptors an den CD4⁺ T-Zellen verminderten sie die Apoptoserate infizierter Zellen.

Mit Hilfe anderer Methoden zur Darstellung apoptotischer Zellen (z.B. dem TUNEL-Protokoll) werden diese Ergebnisse ebenfalls bestätigt. Abbate et al. (2000) untersuchten Isolate peripherer mononukleärer Blutzellen nicht HIV-infizierter Patienten. Diese wurden mit HIV-infizierten T-Helferzellen versetzt. Die Apoptoserate steigerte sich signifikant über die Zeit des Kontaktes der nicht infizierten Zellen zu den infizierten Zellen. Nicht HIV-versetzte Isolate dienten als Kontrolle. Bei diesen erhöhte sich die Apoptoserate nur unwesentlich.

Herbein et al. (1998) infizierten eine Kultur peripherer Blutlymphozyten mit einem fluoreszenzmarkierten HIV-Klon und verfolgten die Apoptoserate. Sowohl bei den infizierten als auch den nicht infizierten Zellen der Kultur stieg die Apoptoserate signifikant an. Die Arbeitsgruppe schloss daraus, dass HIV sowohl direkt in infizierten CD4⁺ T-Lymphozyten Apoptose auslöst als auch, durch antigenpräsentierende Zellen vermittelt, indirekt in nicht infizierten CD4⁺ T-Zellen.

Die Arbeitsgruppe um Holm (2004) inkubierte nicht infizierte CD4⁺ T-Helferzellen mit dem HIV-Hüllprotein env und konnte eine Erhöhung der Apoptoserate nachweisen. Das env-Protein wurde verändert, um seine Affinität zu den Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 zu erhöhen. Je höher die Affinität, umso stärker fiel die Kapazität zur Apoptoseinduktion aus.

Erhöhte Apoptoseraten werden bei HIV-positiven Patienten auch in anderen Zelltypen, wie z.B. CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Thymozyten oder Neuronen nachgewiesen. Der zytotoxischen Aktivität der CD8⁺ T-Lymphozyten wird besonders in der Phase der akuten HIV-Infektion eine maßgebende Rolle in der Bekämpfung des HI-Virus zugeschrieben. Bei nicht therapierten HIV-Patienten ist die Absolutzahl der CD8⁺ T-Lymphozyten erniedrigt. Als Grund für diese Absenkung konnte bei in vitro Versuchen eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden. Apoptoseinduzierend schienen hier Wechselwirkungen zwischen dem HIV-Hüllprotein env und dem CXCR4-Korezeptor, bzw. zwischen TNF α -exprimierenden Makrophagen und dem TNF-Rezeptor der CD8⁺ T-Zellen zu sein (Herbein, G. et al. 1998).

HIV infiziert unter anderem das zentrale Nervensystem (ZNS) der Erkrankten. Das Spektrum der neurologischen oder psychischen Symptome reicht von milden kognitiven Störungen bis hin zur HIV-Enzephalopathie. Die Zielzellen von HIV im

ZNS sind im Wesentlichen Makrophagen und Mikrogliazellen. Astrozyten und Endothelialzellen spielen eine untergeordnete Rolle. Die Arbeitsgruppe um B. Shi wies bereits 1996 eine erhöhte Apoptoserate von Neuronen als auch von Astrozyten in HIV-infizierten, primären Gehirnzellkulturen und in Gehirngewebe von HIV-Patienten nach.

Ebenfalls fallen Thymozyten in allen Entwicklungsstadien HIV-induzierter Apoptose zum Opfer. Da der Großteil dieser Zellen selber nicht infiziert ist, ist eine indirekte Apoptoseinduktion zu vermuten (Su, L. et al. 1995).

4.1.2 HIV-Verlaufsparemeter und Apoptoserate

Der Immunstatus der beiden Untersuchungsgruppen unterschied sich erwartungsgemäß deutlich. Am Tag der Untersuchung wurde von jedem Patient der aktuelle Wert der CD4⁺ T-Lymphozyten bestimmt. Der Median in der Gruppe der HIV-infizierten Patienten lag mit 426 Zellen/µl Vollblut weit unter dem der Gruppe der nicht Infizierten mit 812 Zellen/µl (Abbildung 14). Das entspricht dem in der Literatur beschriebenen Normwert von 600–980 Zellen/µl für gesunde Probanden (Neumeister, B. et al. 2003).

Ein weiterer wichtiger Parameter für den Verlauf der HIV-Infektion ist der CD4⁺ Nadir-Wert. Er steht für die bisher niedrigste im Krankheitsverlauf gemessene CD4⁺ Zellzahl eines Patienten. Gruppe 1 wies einen medianen CD4⁺ Nadir-Wert von 368 Zellen/µl auf (Tabelle 3).

In dieser Arbeit konnte für die Gruppe der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten sowohl eine signifikante Korrelation der Apoptoserate mit dem CD4⁺ Nadir-Wert (Abbildung 19) als auch mit der CD4⁺ Zellzahl am Tag der Untersuchung aufgezeigt werden (Abbildung 20). In beiden Fällen konnte man einen Zusammenhang zwischen niedriger CD4⁺ Zellzahl und steigender Apoptoserate erkennen.

Teilte man die HIV-infizierten Patienten in Untergruppen nach dem CD4⁺ Nadir ein, erkannte man deutlich eine signifikant steigende Apoptoserate mit fallendem CD4⁺ Nadir-Wert. HIV-Infizierte mit einem CD4⁺ Nadir-Wert über 500 Zellen/µl zeigten mit einer Apoptoserate von 9,4 % eine annähernd normale Regulierung der Apoptose. Bei CD4⁺ Nadir-Werte zwischen 200 und 500 Zellen/µl lag die mediane Apoptoserate

bei 10,6 %. Ein Patient wies einen sehr niedrigen CD4⁺ Nadir-Wert kleiner 200 Zellen/ μ l auf. Mit 13,8 %iger Apoptoserate bestätigt dieser den oben gezeigten Trend (Abbildung 22).

Die Arbeitsgruppe um Herbeuval (2005) arbeitete deutlich den Zusammenhang zwischen erhöhter Apoptoserate HIV-infizierter Patienten und den dadurch folgenden Verlust an CD4⁺ T-Zellen heraus.

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gruppe 2 der nicht HIV-Infizierten war keine signifikante Wechselbeziehung zwischen Apoptoserate und CD4⁺ Zellzahl zu entdecken. Die Apoptoserate der PBMC der HIV-negativen Probanden schwankte in einem sehr weiten Bereich zwischen 2 bis 18 % (Tabelle 3). Dies verdeutlicht, dass in Abwesenheit des HI-Virus die Apoptoserate nicht mit einem Verlust an CD4⁺ Helferzellen in Verbindung gebracht werden kann.

Zwischen der Apoptoserate und der HI-Viruslast der Patienten konnte in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation gezeigt werden (vgl. Abschnitt 3.4). Zu dem gleichen Ergebnis kamen Wasmuth et al. (2000). Diese Arbeitsgruppe setzte drei verschiedene, etablierte Protokolle zum Apoptosenachweis ein, die Färbung mit Annexin V-FITC, wie in der vorliegenden Arbeit, die Markierung mit CD95-FITC und den Apopstain-Protokoll. Alle drei Methoden zeigten äquivalente Apoptoseraten, aber eine Korrelation zwischen dieser und der HI-Viruslast bestand nicht.

Dies bestätigt sich in den Ergebnissen von Rothen et al. (1997), die die Apoptoserate bereits in frühen Stadien der HIV-Infektion bei geringer Krankheitsprogression nachweisen konnten. Diese Arbeitsgruppe fand ebenfalls keine Korrelation zwischen Apoptoserate und der Anzahl der HIV-RNA Kopien im Plasma der Patienten.

Dazu gegenteilig berichtet die Arbeitsgruppe um Samuelsson (1997) in ihrer Veröffentlichung von einer Korrelation der Viruslast mit der Apoptoserate. In dieser Untersuchung wurden die HIV-Patienten in zwei Gruppen geteilt. Gruppe 1 mit einem CD4⁺-Status von weniger als 200 Zellen/ μ l Vollblut, Gruppe 2 mit mehr als 400 CD4⁺-Zellen/ μ l. In beiden Gruppen war eine signifikante Korrelation zu sehen. Des Weiteren inaktivierte die Arbeitsgruppe das HI-Virus in den PBMC-Isolaten und konnte einen signifikanten Abfall der Apoptoserate nachweisen.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse spiegeln die Komplexität der Apoptosesteuerung wieder. HIV-Proteine können Apoptose sowohl induzieren als auch inhibieren. Überdies sind das HI-Virus bzw. die HIV-Infektion neben der generalisierten Immunaktivierung nur zwei vieler möglicher Apoptoseinduktoren (Varbanov, M.E. et

al. 2006). Zusätzlich gelten die Hochregulation von Zytokinen durch zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten, die Synzytienbildung oder der indirekte Weg über FAS-Exprimierung als HIV-Protein unabhängige Apoptoseauslöser (Alimonti, J. et al. 2003).

4.1.3 HIV-Infektion und mitochondriales Membranpotential

Ein stabiles mitochondriales Membranpotential ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Funktion der Mitochondrien. Ein erniedrigtes Membranpotential bedeutet eine geringere Polarisierung der Mitochondrienmembran und somit eine Behinderung der Funktion der Atmungskette sowie der ATP-Bildung. Die Einschränkung der mitochondrialen Funktion durch Abfall des MMPs kann als Folge einer Mitochondrienschädigung betrachtet werden (Polo, R. et al. 2003). Das sinkende MMP wird mit der Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität und der daraus resultierenden Apoptoseinduktion in Verbindung gebracht (Badley, A.D. et al. 2003). Viele der pathologischen Prozesse in der Entwicklung von AIDS und dessen Komplikationen sind auf mitochondrienvermittelte Apoptose zurückzuführen (Phenix, B.N. et al. 2002). Es wurde schon von Fällen mitochondrialer Fehlfunktionen aus den späten 1980er Jahren berichtet. Dort traten bei sieben antiretroviral unbehandelten HIV-Patienten schwere Fälle von Laktatazidose auf, die mit HIV-bedingter Mitochondrienschädigung in Verbindung gebracht wurden. Des Weiteren wird von mitochondrialen Myopathien bei HAART-naiven, HIV-Infizierten berichtet (Cherry, C.L. et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 47 HIV-positiven, bisher therapienaiven Patienten und bei 29 HIV-negativen Probanden das MMP ermittelt. In der Gruppe 1 war es mit 684 % signifikant niedriger als in der gesunden Kontrollgruppe mit 828 % (Tabelle 3, Abbildung 12)

In einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnten signifikant erniedrigte MMP an PBMC therapienaiver HIV-Patienten im Vergleich zu antiretroviral therapierten HIV-infizierten Patienten und im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollpersonen gezeigt werden (Sternfeld, T. et al. 2007). Macho et al. (1995) untersuchten das MMP an T-Lymphozyten. Ihre Ergebnisse bestätigen die der vorliegenden Arbeit. Das MMP in den T-Lymphozyten der HIV-infizierten, therapienaiven Patienten war im

Vergleich zu dem der gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (Petit, F. et al. 2005).

Fernández Larrosa et al. (2008) untersuchten Unterschiede in der Apoptoseinduktion an HIV-infizierten und nicht infizierten Lymphoid-Zellreihen. Zur Bestimmung des Grundzustandes der Zellen ermittelte die Arbeitsgruppe das jeweilige mitochondriale Membranpotential. Sie stellten analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit ein signifikant erniedrigtes MMP der HIV-infizierten Zellen fest.

Die Arbeitsgruppe um Hahn (2008) untersuchte den Einfluss von HIV-infizierten und aktivierten Makrophagen auf Neurone der Hinterwurzelganglien. Die Neurone, die nicht den infizierten Makrophagen ausgesetzt wurden zeigten ebenfalls ein signifikant höheres MMP im Vergleich zu denen, die den HIV-infizierten Makrophagen ausgesetzt waren.

Einschränkungen der mitochondrialen Funktion während der HIV-Infektion wurden von Miró et al. (2004) auch durch Messungen des mtDNA-Gehaltes und der Bestimmung der Aktivitäten verschiedener Atmungsketten-Komplexe nachgewiesen. Es wurden isolierte PBMC HIV-infizierter Patienten und nicht infizierter Probanden untersucht. Sowohl der mtDNA-Gehalt als auch die Aktivität der Atmungsketten-Komplexe war in den isolierten PBMC HIV-infizierter Patienten signifikant erniedrigt.

Macho et al. (1995) konnten keinen Zusammenhang zwischen dem mitochondrialen Membranpotential und dem klinischen Status der HIV-Infektion (akute Infektion und chronische Phase gegen AIDS) nachweisen. Allerdings benutzte diese Arbeitsgruppe einen Farbstoff (DiOC₆), der eine für Mitochondrien nicht ausreichende Spezifität und eine ungenügende Sensitivität für Schwankungen des Membranpotentials aufweist (Vayssier-Taussat, M. et al. 2002).

Es gibt unterschiedliche Auslöser für HIV-induzierte Mitochondrienschädigung. Nach de Mendoza et al. (2004) führt die verkürzte Halbwertszeit der CD4⁺ T-Lymphozyten bei der HIV-abhängigen Immunaktivierung zu einer Einschränkung der mitochondrialen DNA-Replikation.

Nach Gougeon (2003) ist die erhöhte Apoptoserate der Auslöser der mitochondrialen Funktionsstörung und der CD4⁺ T-Zell Zerstörung.

Auch Miura et al. (2003) betonten die Bedeutung der erhöhten, mitochondrienvermittelten Apoptoserate von T-Helferzellen bei der HIV-Infektion.

Wenn auf den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials eine Cytochrom c Freisetzung folgt, wird unweigerlich der intrinsische Apoptosesignalweg eingeleitet.

4.1.4 HIV-Verlaufsparemeter und mitochondriales Membranpotential

Betrachtet man in dieser Arbeit die Korrelationen zwischen Immunstatus und mitochondrialem Membranpotential, sieht man Parallelen zur Apoptoserate. Für die Gruppe 1 der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten konnte eine signifikante Korrelation sowohl zwischen dem CD4⁺ Nadir-Wert (Abbildung 17) und dem MMP als auch der aktuellen CD4⁺ Zellzahl am Tag der Untersuchung und dem MMP (Abbildung 18) festgestellt werden. Die Kontrollgruppe 2 zeigte keinen Zusammenhang zwischen CD4⁺ Zellzahl am Tag der Untersuchung und MMP.

Eine HIV-positive Patientin zeigte ein erstaunlich hohes MMP von 1140 %, was sogar für nicht HIV-Infizierte ungewöhnlich hoch ist. Die Apoptoserate ihrer PMBC lag mit 8,5 % im niedrigeren Bereich. Die Patientin ist im April 1987 zum ersten Mal positiv auf HIV getestet worden. Seitdem kontrollierte sie das Virus ohne Hilfe einer HAART. Sie zeigte eine zwar nachweisbare, aber doch niedrige HI-Viruslast von 596 RNA-Kopien/ml. Der aktuelle CD4⁺ Wert am Tag der Untersuchung war mit 414 Zellen/ μ l nach 231 Monaten gesicherter Infektion erstaunlich gut. Diese Patientin gehört zu der Gruppe der *long term non progressor*, die im Abschnitt 4.5.2 dieses Kapitels näher betrachtet werden.

Korrelierte man die Viruslast der HIV-Infizierten mit dem MMP zeigte sich eine schwache, negative Signifikanz (Abbildung 23). Polo et al. (2003) zeigten eine Verminderung des MMPs bei höheren Viruslasten. Vermutlich begründet durch eine vermehrte Bindung von HIV-Proteinen an zelluläre Rezeptoren oder durch die HIV-bedingte erhöhte Zytokinproduktion.

Dies wird durch Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt.

Haugaard et al. (2005) konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der Viruslast und dem Gehalt an mtDNA bei HIV-positiven, antiretroviral therapienaiven Patienten aufzeigen. Die Arbeitsgruppe um Miura (2003) veröffentlichte analoge Ergebnisse.

Vergleiche des mtDNA-Gehaltes therapienaiver HIV-Infizierter mit nicht HIV-infizierten Kontrollpersonen verdeutlichten den Zusammenhang des Abfalls der mitochondrialen DNA mit der HIV-Infektion (Miró, O. et al. 2004), (Chiappini, F. et al. 2004), (Côté, H.C. et al. 2002). Maagaard et al. (2006) bezweifelten allerdings eine direkte Auswirkung des mtDNA-Gehaltes auf die Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien. Dementsprechend scheint die Messung des MMPs zur Bestimmung mitochondrialer Funktionsstörungen aussagekräftiger zu sein.

4.2 Apoptoserate und mitochondriales Membranpotential

In der vorliegenden Arbeit konnte in beiden Gruppen, sowohl bei den HIV-infizierten- als auch bei den nicht infizierten Personen, eine hohe, signifikante, negative Korrelation zwischen den Parametern der Apoptoserate und des MMPs gezeigt werden (Abbildung 15, Abbildung 16).

Auch Laforge et al. (2007) zeigten in ihrer Arbeit diesen Zusammenhang. Sie transfizierten isolierte CD4⁺ T-Lymphozyten mit einem, das HIV-Protein nef exprimierenden Vektor. Dies führte über die Freisetzung von Cathepsin D aus Lysosomen zu einem Zusammenbruch des MMPs und einem Anstieg der Apoptoserate.

Die Arbeitsgruppe um Lugli (2005) induzierte mit Quercetin die Apoptose in U397 Zellen. Über einem Zeitraum von zwei Stunden konnten sie zuerst die Abnahme des MMPs anhand der JC-1-Färbung und darauf folgend die Frühphase der Apoptose durch Markierung des, auf die Membranaußenseite umgeklappten Phosphatidylserins mit Annexin V-FITC nachweisen.

Ein niedriges mitochondriales Membranpotential kann entweder die Apoptose initiieren oder charakterisiert einen Zwischenschritt der Apoptose (Troiano, L. et al. 2007).

Eine Gegenthese zu dieser Meinung veröffentlichten Lenardo et al. (2002) mit ihrer Untersuchung an Jurkat T-Zellen. Sie infizierten die Zellen entweder mit natürlichem oder genetisch verändertem HIV-Hüllprotein env. An beiden Zellkulturen fanden sie Anzeichen, die eher auf Nekrose als auf Apoptose hindeuten.

4.3 Weitere Einflussfaktoren auf die Mitochondrienfunktion

Seit Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) ist die Morbidität und Mortalität durch HIV drastisch gesunken. Die HI-Virämie kann unter einer HAART unter die Nachweisgrenze gesenkt werden, die CD4⁺ Zellzahl kann deutlich ansteigen. So kommt es zu einem verzögerten Fortschreiten der HI-Infektion, zu einer Abnahme opportunistischer Infektionen und damit zu einer erheblichen Lebenszeitverlängerung (Karow, T. et al. 2001). Doch im Laufe der antiretroviralen Langzeittherapie wird das Management von unerwünschten Arzneimittelwirkungen immer bedeutsamer. Die Aufmerksamkeit hat sich im Besonderen auf die mitochondriale Toxizität der Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) fokussiert. NRTI blockieren nach intrazellulärer Phosphorylierung sowohl die Reverse-Transkriptase des HIV als auch die humanen DNA-Polymerasen. In Mitochondrien ist die DNA-Polymerase γ für Replikation und Reparatur der mtDNA zuständig. Der Einfluss der Medikamente auf die mitochondriale DNA-Polymerase γ führt über die Hemmung dieses Enzyms zu einer mtDNA-Depletion oder –Mutation, Energieverarmung der Zellen und oxidativem Stress. Daraus resultiert die funktionale Schädigung der Mitochondrien (Brinkman, K. et al. 1998), (Kakuda, T.N. 2000). Durch Störungen der oxidativen Phosphorylierung kann es zum Ansteigen des Laktatspiegels, in Extremfällen bis hin zur Entwicklung einer Laktatazidose kommen (Walker, U.A. 2004). Veränderung in der mitochondrialen Ultrastruktur und Verminderung der mtDNA können in subkutanem Fettgewebe zu Lipodystrophien und in Muskelzellen zu Myopathien führen (McComsey, G.A. et al. 2004). Des Weiteren wird von der Entwicklung hepatischer Steatosen, peripherer Neuropathien und Pankreatiden berichtet (White, A.J. 2001), (Cossarizza, A. et al. 2004), (Walker, U.A. et al. 2005).

Aber wie in im oberen Abschnitt 4.1 beschrieben, schädigen HIV-Proteine auch direkt die Mitochondrien, führen zu oxidativem Stress und zur mtDNA-Depletion. Berichtet wird von Fällen mitochondrialer Myopathien und peripherer Neuropathien bei antiretroviral therapienaiven HIV-Patienten (Morgello, S. et al. 1995). Schwere Fälle von Laktatazidose werden beschrieben (Cherry, C.L. et al. 2005). Möglicherweise gehen diese klinischen Symptome der mitochondrialen Schädigung durch die HIV-Infektion denen durch NRTI voraus. Vielleicht werden Mitochondrien durch einen

langfristigen Einfluss des HI-Virus anfälliger für mitochondriale Toxizität der NRTI (Lewis, W. 2003).

4.4 Therapieansätze zur Verminderung der Apoptoserate und der mitochondrialen Dysfunktion

Der Einsatz einer effektiven antiretroviralen Therapie führt zu einem Anstieg des mtDNA-Gehaltes. Dies konnte selbst bei der Gabe von Medikamenten, die nachgewiesenermaßen die DNA-Polymerase γ schädigen, beobachtet werden (Gallant, J. et al. 2002). Auch das MMP liegt bei antiretroviral behandelten Patienten über dem der HAART-Naiven (Sternfeld, T. et al. 2007). So wäre für die individuelle Entscheidung, ob eine antiretrovirale Therapie indiziert ist, das Betrachten des Mitochondrienstatus sinnvoll. Wenn die Parameter Viruslast und $CD4^+$ Zellzahl nicht gegen eine Therapie sprechen, könnte die Möglichkeit einer HAART erwogen werden, um entstehenden Langzeitschäden durch mitochondriale Dysfunktion vorzubeugen. Hierbei sind antiretrovirale Medikamente mit geringerer mitochondrialer Toxizität wie z. B. Tenofovir, Lamivudin, Emtricitabin oder Abacavir denen mit erhöhter Toxizität wie Didanosin, Stavudin oder Zidovudin vorzuziehen (Cossarizza, A. et al. 2004).

Auch die apoptotische Aktivität kann mit Hilfe einer HAART gesenkt werden. Die Arbeitsgruppe um Erhard (2008) bestimmte die Expression proapoptotischer (FAS, TRAIL, aktive Caspase 3) und antiapoptotischer Moleküle (Bcl-2, IL-7) in Leistenlymphknoten HIV-positiver Patienten. Die Messzeitpunkte lagen zu Beginn der Studie und nach einem Zeitraum von 16 bis 20 Monaten nach Beginn einer hochaktiven antiretroviralen Therapie. Die anfänglich auffälligen Werte der apoptotischen Moleküle fielen auf das Niveau HIV-negativer Kontrollpersonen. Die Arbeitsgruppe schloss daraus, dass eine in frühen Stadien der HIV-Infektion initialisierte HAART apoptotische Prozesse normalisieren könnte.

Ein weiterer Ansatz ist die Gabe von Triacetyluridin (TAU). Die Hemmung der Atmungskette durch mtDNA-Verarmung bewirkt eine Inhibition der Dehydroorotatdehydrogenase. Die Uridinsynthese wird vermindert, es folgt eine reduzierte Produktion von mitochondrialen Pyrimidinen und der Gehalt an mtDNA sinkt weiter (Walker, U.A. et al. 2005). Dieser Teufelskreis könnte durch die Zuführung von TAU unterbrochen werden. Fallberichte für die Wirksamkeit von TAU

sind für antiretroviral therapierte Patienten beschrieben. Walker und Venhoff berichteten von verminderter Apoptoserate, erhöhtem MMP und gestiegenem mtDNA-Gehalt in Adipozyten (Walker, U.A. et al. 2005).

4.5 Infektionsdauer und Apoptoserate beziehungsweise mitochondriales Membranpotential

4.5.1 Patienten mit progredientem Infektionsverlauf

In der Gruppe der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten wurde der Zusammenhang zwischen der Apoptoserate bzw. dem MMP und der Infektionsdauer betrachtet. Es zeigte sich weder für die Apoptoserate noch für das MMP eine Korrelation mit dem Zeitraum seit dem ersten positiven HIV-Test. Allerdings zeigen vier der 47 HIV-Patienten einen ungewöhnlichen Verlauf der Infektion. Sie kontrollieren alle seit über 18 Jahren das HI-Virus ohne antiretrovirale Therapie. Lässt man diese Patienten aus der Auswertung heraus, so findet man signifikante Korrelationen zwischen der Infektionsdauer und sowohl der Apoptoserate als auch dem MMP. Das bedeutet, je länger eine HIV-Infektion andauert, umso stärker ist die Apoptose der PBMC ausgeprägt bzw. umso instabiler ist das mitochondriale Membranpotential. Dies entspricht erwartungsgemäß dem typischen Fortschreiten einer HIV-Infektion.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnte lediglich der Zeitraum seit dem ersten positiven HIV-Test als Infektionsdauer bewertet werden. Die tatsächliche Infektionsdauer könnte durchaus wesentlich länger sein.

4.5.2 *Long term non progressors*

Die vier Patienten, die in dieser Arbeit als *long term non progressors* (LTNP) bezeichnet werden, sind seit mehr als 18 Jahren HIV-infiziert. Keiner der LTNP hatte einen CD4⁺ Nadir-Wert kleiner als 300 Zellen/ μ l Vollblut. Am Tag der Untersuchung lagen die CD4⁺ Zellzahlen über 450 Zellen/ μ l und die Viruslast bei jedem der vier Patienten unter 600 HIV-RNA Kopien/ml Vollblut.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem MMP und der Infektionsdauer gezeigt werden. Die Angaben zur Apoptoserate waren statistisch nicht verwertbar. Durch die kleine Fallzahl der Messungen des MMPs

(n=4) und der Apoptoserate (n=2) in der Gruppe der LTNP können statistisch keine direkten Aussagen getroffen werden.

In aktuellen Veröffentlichungen wird das Phänomen der LTNP näher beschrieben. Peraire et al. (2007) zeigten in ihrer Untersuchung, dass der mtDNA-Gehalt und die Aktivität der Enzyme der mitochondrialen Atmungsketten von LTNP im Vergleich zu denen gesunder Kontrollpersonen nur gering erniedrigt waren. Allerdings war der Abfall dieser Parameter bei typisch progredienten HIV-Patienten in Bezug auf die LTNP signifikant. Analog war die Caspase 3 Aktivität der LTNP im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe nur leicht erhöht. Die der typisch progredienten HIV-Patienten war in Bezug auf die LTNP signifikant erhöht. Die Arbeitsgruppe schloss daraus, dass die LTNP verglichen mit den typisch progredienten HIV-Infizierten eine geringere mitochondrienvermittelte Apoptose und einen geringeren Funktionsverlust der Mitochondrien aufweisen.

Die Arbeitsgruppe um Lum (2003) macht für die Absenz des Immundefektes bei LTNP die R77Q Mutation des HIV-Proteins vpr verantwortlich. Diese Mutation fanden sie bei 80 % der LTNP, aber nur bei 33 % der typisch progredienten HIV-Patienten. Die Arbeitsgruppe untersuchte des Weiteren Zellreihen mit dem Wildtyp des vpr-Proteins und mit mutierten R77Q-Peptiden. Die Wildtyp-Zellen zeigten im Vergleich zu denen des mutierten Proteins ein erniedrigtes mitochondriales Membranpotential, eine erhöhte Caspase 3 Aktivität und eine DNA-Fragmentierung als Zeichen für verstärkte Apoptose.

Eine Hypothese ist, dass LTNP in der Summe der schädigenden Einflüsse nicht den Grenzwert für signifikante Schädigungen der Mitochondrien erreichen (Peraire, J. et al. 2007).

4.6 Geschlecht und Apoptoserate beziehungsweise mitochondriales Membranpotential

Betrachtete man die Geschlechter isoliert, so konnte man im Vergleich der HIV-negativen Männer zu den HIV-Infizierten eine signifikant geringere Apoptoserate (Abbildung 31) und signifikant höheres MMP (Abbildung 30) bei den nicht HIV-infizierten Männern erkennen. Bei den Frauen galt das gleiche für das MMP (Abbildung 29), nicht aber bei der Apoptoserate. Allerdings war die Apoptoserate der HIV-infizierten Frauen gegenüber der der HIV-negativen Frauen sichtlich erhöht. Die

geringere Apoptoserate und das stabilere MMP der HIV-negativen Kontrollgruppe konnte nach den in dieser Arbeit schon diskutierten Einflüssen der HIV-Infektion auf die PBMC und deren Mitochondrien (vgl. Abschnitt 4.1) erwartet werden.

Verglich man die Apoptoserate und das MMP innerhalb der einzelnen Gruppen zwischen den Geschlechtern, so erkannte man dass sowohl für Gruppe 1 als auch für Gruppe 2 die Werte der Frauen nur unwesentlich besser waren. Es konnten in keiner Gruppe signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede der Meßparameter gezeigt werden. Ein Einfluss des Geschlechts auf die Apoptoserate bzw. das MMP kann aus den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit nicht belegt werden.

Der Anteil der *long term non progressors* lag bei den Frauen bei 14 %, bei den Männern nur bei 7 %. Ob dies maßgebend sein könnte, wird in Abschnitt 4.5.2 dieses Kapitel näher diskutiert. Andere Parameter, wie CD4⁺ Zellzahl oder Alter zeigten keine signifikanten Unterschiede.

4.7 HIV-/ Hepatitis-Koinfektion und Apoptoserate beziehungsweise mitochondriales Membranpotential

Sieben der 47 HIV-infizierten Patienten waren mit einem Hepatitis Virus koinfiziert. Zwei Patienten hatten eine positive HBV-Serologie, fünf eine positive HCV-Serologie. Weder bei der Betrachtung der HIV-/ Hepatitis B- und -C Koinfizierten, noch bei der isolierten Betrachtung der HIV-/ HCV-koinfizierten Patienten konnte eine signifikante Änderung der Apoptoserate oder des mitochondrialen Membranpotentials im Vergleich zu den übrigen HIV-Infizierten festgestellt werden. Die AST- und die ALT-Werte waren bei den koinfizierten Patienten signifikant erhöht, die GGT-Werte nur leicht.

Núñez et al. (2006) zeigten in ihrer Untersuchung eine signifikante Erhöhung der Apoptosewerte der HIV-/ HCV-koinfizierten im Vergleich zu den rein HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten.

Die Arbeitsgruppe um de Mendoza (2005) zeigte, dass bereits eine reine HCV-Infektion zu einer Abnahme des mtDNA-Gehaltes führen kann.

Das Hepatitis C-Virus kann analog dem HI-Virus die Apoptose von PBMC induzieren und deren Mitochondrien schädigen (Taya, N. et al. 2000).

Die Annahme, dass die mitochondriale Schädigung und die Apoptoserate durch HIV durch eine HCV-Infektion noch verstärkt werden, konnte in dieser Untersuchung

nicht bestätigt werden. Da allerdings die Gruppe der HIV-/ HCV-Koinfizierten mit fünf Patienten sehr klein war, lassen sich aus den hier dargestellten Ergebnissen keine repräsentativen Rückschlüsse ziehen.

4.8 Limitation

Die Ergebnisse wurden in einer Querschnittsuntersuchung des Patientenkollektivs der Medizinischen Poliklinik der LMU München erstellt. Somit stand eine beschränkte Zahl an Patienten, die HIV-infiziert und antiretroviral therapie-naiv waren, für die Untersuchung zur Verfügung.

Um verschiedene Einflüsse, wie CD4-Status, Viruslast, Geschlecht und Infektionsdauer abzuschätzen, mussten kleinere Untergruppen gebildet werden. Die Aussagekraft der statistisch ermittelten Ergebnisse und Zusammenhänge sinkt mit der Fallzahl der Untersuchungen.

Die Darstellung der Ergebnisse als allgemein gültig ist nicht ohne weiteres möglich. Die Untersuchungsmethoden beschränkten sich darauf, das mitochondriale Membranpotential zu bestimmen und Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran peripherer mononukleärer Blutzellen nachzuweisen. In dieser Arbeit wurden diese beiden Größen stellvertretend für die mitochondriale Funktionstüchtigkeit und die Apoptoserate betrachtet. Fraglich ist, ob die Ergebnisse, die an PBMC gefunden wurden, analog für den Status dieser Parameter von CD4⁺ T-Lymphozyten gelten.

Aussagen über die Ursache-Wirkungs-Beziehung von Ergebnisse zu treffen ist im Allgemeinen schwierig. Ein Bezug von den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen auf das HI-Virus und die HIV-Infektion wurde u. a. mit Hilfe des Zurückgreifens auf Veröffentlichungen und Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen dargestellt.

4.9 Ausblick

Die hier vorgestellte Arbeit konnte einen Einblick in die Funktion der Mitochondrien und die Apoptoserate der peripheren mononukleären Blutzellen HIV-positiver, therapie-naiver Patienten geben.

Das mitochondriale Membranpotential stellt einen Indikator für die Störungen der Mitochondrienfunktion von PBMC dar. Die Apoptoserate bezieht sich auf diejenigen

PBMC, die, von außen angeregt oder durch zellinterne Prozesse stimuliert, ihren Zelltod auslöst.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, der Vergleich des MMPs und der Apoptoserate zwischen HIV-infizierten, therapienaiven Patienten als auch der gesunden Kontrollgruppe wirft interessante Fragen auf.

Nachdem diese Arbeit auf der Untersuchung isolierter PMBC beruht, wäre es wichtig auch andere, relativ leicht zugängliche Zellen, wie z. B. Myo- oder Adipozyten zu betrachten. Interessant wäre, ob die Ergebnisse der Messungen an PBMC für andere Gewebe repräsentativ sind.

Als Ursache für die Funktionsminderung der Mitochondrien oder die erhöhte Apoptoserate werden HIV-Proteine direkt oder Zytokine verantwortlich gemacht, die nach der Immunaktivierung verstärkt exprimiert werden. Das legt die Vermutung nahe, dass Proteine anderer Viren ähnlich wirken könnten. Es besteht auch die Möglichkeit, dass Patienten mit einer Infektion mit generalisierter Immunaktivierung ähnliche Werte vorweisen könnten. Die Untersuchung anderer Kollektive, wie z. B. Hepatitis- oder Sepsis-Patienten, könnte darüber Aufschluss bringen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer HIV/ HCV-Koinfektion nur knapp angesprochen. Die Inzidenz der angesprochenen Koinfektion ist jedoch nicht zu vernachlässigen. Weiterführende Untersuchungen zur Mitochondrienfunktion und Apoptose der PBMC dieser Patientengruppe hätten eine große klinische Bedeutung. Untersuchungen zur Apoptoserate und zur Mitochondrienfunktion bei HIV-Patienten wurden sowohl an therapierten, an nicht therapierten Patienten als auch an beiden Kollektiven durchgeführt. Wie stark die mitochondrienschädigenden Einflüsse der HIV-Infektion einerseits und der HAART andererseits sind, lässt sich jedoch bisher schwer einschätzen. Um dies zu klären, bedarf es Untersuchungen zum Einfluss der HAART bei nicht infizierten Patienten, wie z. B. neugeborenen, nicht infizierten Kindern HIV-positiver Mütter, die prophylaktisch behandelt werden.

Darauf folgt die Frage über die klinische Bedeutung der gemessenen Parameter. Es gibt Leitlinien zur Indikation einer antiretroviralen Therapie. Maßgeblich dafür sind neben der CD4⁺ Zellzahl die Viruslast und die klinischen Symptome. Die klinischen Symptome werden ihrerseits vom Mitochondrienstatus und der Apoptoserate der PBMC beeinflusst. Abzuschätzen wäre ob und in wieweit die in dieser Arbeit gemessenen Parameter in die Verlaufskontrolle der HIV-Infektion und die Indikationsstellung einer antiretroviralen Therapie miteinbezogen werden können.

5 Zusammenfassung

Die HIV-Infektion ist durch einen progressiven Verlust an CD4⁺ T-Lymphozyten charakterisiert, der das Auftreten von AIDS zur Folge hat. Die Apoptose gilt als wichtigster Mechanismus des Verlustes an sowohl infizierten als auch nicht infizierten CD4⁺ Zellen. Allerdings ist dieses komplexe System von inhibierenden und induzierenden Faktoren noch nicht vollständig geklärt. Die mitochondriale Dysfunktion spielt eine Schlüsselrolle in der Apoptose. Sie kann die Apoptosekaskade anstoßen oder einen Zwischenschritt der Apoptose darstellen.

Proteine des HI-Virus können Mitochondrien direkt schädigen und über den Verlust der mitochondrialen Membranintegrität Apoptose induzieren. Auch indirekt kann eine HIV-Infektion über die verstärkte Bildung von Zytokinen oder den Kontakt infizierter zu nicht infizierten Zellen (FAS/ FAS-Ligand) die Apoptosekaskade initiieren.

Bislang gab es keine verlässlichen Methoden das Ausmaß der Mitochondrienschädigung oder der Apoptose HIV-infizierter Patienten zu beurteilen. Für die Routinekontrolle des Krankheitsverlaufes, sowohl ohne als auch mit einer antiretroviralen Therapie, wäre aber eine Möglichkeit der Bestimmung dieser Parameter von höchster Bedeutung.

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, das mitochondriale Membranpotential der PBMC und deren Apoptoserate zu untersuchen. Als Untersuchungsgruppen dienten HIV-infizierte, antiretroviral therapienaive Patienten und nicht HIV-infizierte Personen als Kontrollgruppe.

Die Mitochondrien wurden auf ihr Membranpotential mit Hilfe der JC-1 Färbung geprüft. Bei den PBMC wurde die Apoptoserate durch die Annexin V-FITC Färbung bestimmt. Ein Vorteil der gewählten Methoden besteht darin, dass sie kostengünstig, gering invasiv und klinisch relativ einfach durchzuführen sind. Beide Methoden haben sich während dieser Untersuchung als sehr gut und empfindlich bewährt. Die Reproduzierbarkeit der Messungen beider Methoden wurde im Vorfeld dieser Arbeit bestätigt.

Um sich ein Bild über den Einfluss der HIV-Infektion auf die Mitochondrien und die Apoptoserate der PBMC zu machen, wurden die Ergebnisse in Bezug auf weitere klinische und biochemische Parameter betrachtet.

Die HIV-infizierten Patienten wiesen im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe ein signifikant erniedrigtes mitochondriales Membranpotential und eine signifikant erhöhte Apoptoserate der PBMC auf.

In beiden Gruppen korrelierte das MMP mit der Apoptoserate, was bedeutet, dass ein erniedrigtes MMP mit einer verstärkten Apoptose in Zusammenhang steht.

Korrelierte man das MMP und die Apoptoserate mit der CD4⁺ Zellzahl, so erkannte man, dass diese Parameter nur bei den HIV-Infizierten zusammenhängen. Durch die Unterteilung der Untersuchungsgruppen nach CD4⁺ Status in drei Untergruppen (<200-, 200-500-, >500 Zellen/ μ l Vollblut) erkannte man bei den HIV-Patienten ein signifikantes Ansteigen des MMPs und ein signifikantes Abfallen der Apoptoserate mit besserem Immunstatus.

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang des MMPs mit der HI-Viruslast, nicht aber der Apoptoserate mit der Viruslast gezeigt werden.

Eine Korrelation zwischen Infektionsdauer, Apoptoserate bzw. MMP zeigte sich erst, als die HIV-Patienten ohne die Gruppe der LTNP betrachtet wurden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Zusammenhang der Mitochondrienfunktion der PBMC und deren Apoptoserate mit dem HI-Virus bzw. der HIV-Infektion.

Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass ein niedriges mitochondriales Membranpotential Ausdruck einer erhöhten Apoptoserate ist. Entweder stellt ein niedriges MMP einen Zwischenschritt der Apoptose dar oder es induziert die Apoptose. Eine hohe Viruslast und ein schlechter Immunstatus können sich u. a. in einem erniedrigten mitochondrialen Membranpotential auswirken. Die dadurch gestörte Membranintegrität kann über Cytochrom c Freisetzung zu einem Anstieg der mitochondrienvermittelten Apoptose führen.

6 Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Geräte

Tabelle 4: verwendete Geräte und deren Hersteller

Brutschrank HeraCell®		Heraeus, Hanau
CO ₂ -Gasflaschenmonitor		
FACScan Durchflusszytometer		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mikroskop Leica DM IL		Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Pipetboy acu		Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Multipipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
	Reference® fix	
	Research® fix	
Schüttelgerät Vortex Genie® 2		IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sicherheitswerkbank	Safe 2010 Model 1.2	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
	LabGard™ 430 Class II	NuAire Inc., Plymouth, USA
elektronischer Zellzähler Casy® 1 TT		Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifugen	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
	Rotanta/RPC	Hettich AG, Bäch, Schweiz

6.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: verwendete Materialien zum Einmalverbrauch und deren Hersteller

Combitips® plus, 5 ml		Eppendorf AG, Hamburg
Einmalpipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml		TPP AG, Torsadingen, Schweiz
Falcon™ Röhrchen, 5 ml, Rundboden, 12x75 mm		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kova®-Zählkammer, 10er Raster		Hycor Biochemical GmbH, Kassel
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl		Peske, Aindlingen, Arnhofen
Reaktionsgefäß Eppendorf Tube 3810, 2ml		Eppendorf AG, Hamburg
S-Monovetten	Serum, 9 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
	Kalium-EDTA, 4 ml	
Zentrifugenröhrchen, Polypropylen, 15 ml, 50 ml		TPP AG, Torsadingen, Schweiz

6.1.3 Probenmaterial, Reagenzien und Medium

Tabelle 6: verwendete Blutproben, Chemikalien, Reagenzien und Nährmedien

Annexin V-FITC Apoptose Detection Kit I	Annexin V-FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
	Propidiumiodid Farbstofflösung	
	Annexin Bindungspuffer (10x), Ca ²⁺ -haltig	
Biocoll (Ficoll®) Trennlösung der Dichte 1,077 g/ml		Biochrom AG, Berlin
peripher-venös entnommene Blutproben		gesamtes Probandenkollektiv
Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP) ^c		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Casy [®] ton Verdünnungslösung		Schärfe System GmbH, Reutlingen
Dimethylsulfoxid (DMSO) Konzentration>99,5 % ^b		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's PBS (1x). ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (DPBS)		PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ethanol 96 % ^c		Merck KGaA, Darmstadt
FACSFlow [™] Fließmittel		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSLyse Lösung [™] (10x)		
fetales Kälberserum (FCS) ^a		PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
Penicillin / Streptomycin (100x) ^a		
RPMI 1640 (1 x) mit L-Glutamin ^a		
5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) ^b		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TriTest CD3 FITC / CD8 PE / CD45 PerCP		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
TriTest CD3 FITC / CD4 PE / CD45 PerCP		

Trypanblau-Lösung 0,4 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
destilliertes Wasser	B. Braun, Melsungen

^a (supplementiertes Nährmedium: RPMI 1640 (1 x) + 1 % Penicillin / Streptomycin (100 %) + 5 % FCS

^b JC-1 Stocklösung 3,08 µM: 5 mg JC-1 + 2,5 ml DMSO

^c FCCP-Lösung: 4 µM in Ethanol 96 %

6.1.4 Software

Tabelle 7: verwendete Software

EndNote® Version X	Thomson Scientific, London, Großbritannien
FACS CELLQuest™ Version 3.1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS MultiSet™ System	
Microsoft® Office Word 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
SPSS® Version 15.0	SPSS GmbH, München

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungen

AIDS	<i>Aquired immunodeficiency syndrom</i> , erworbenes Immunschwächesyndrom
AK	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CCR5	C-C Chemokinrezeptor 5
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Oberflächenmolekül
CoA	Coenzym A
CRP	C-reaktives Protein
CTL	Zytotoxische CD8 ⁺ T-Lymphozyten
CXCR4	C-X-C Chemokinrezeptor 4
DiOC ₆	3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> , Pufferlösung
dUTP	2'-Deoxyuridin 5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
env	<i>Envelope</i> , HIV-Hüllproteine
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FAD	Flavin-Adenin-Nukleotid
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	<i>Forward scatter</i>
gag	Gruppenspezifische Antigene
GGT	γ-Glutamyltransferase
gp	Glykoprotein
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HBV	Hepatitis B Virus

HCV	Hepatitis C Virus
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HIV	Humanes Immunschwächevirus
IAP	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i> , apoptosehemmende Proteine
INF	Interferon
IL	Interleukin
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid
LDH	Laktatdehydrogenase
Ig	Dekadischer Logarithmus
LMU	Ludwigs-Maximilians Universität München
LTNP	<i>Long term non progressors</i>
ltr	<i>Long terminal repeats</i> , endständige Wiederholungen von DNA-Sequenzen
Max	Maximum
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minimum
MMP	Mitochondriales Membranpotential
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA
mtDNA	Mitochondriale DNA
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
p	Protein
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PE	Phycocerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidiumiodid
pol	Polymerase, enzymkodierende Polyproteinsequenz
PS	Phosphatidylserin
Q _{0,75} -Q _{0,25}	Interquartilbereich
RNA	Ribonukleinsäure
SSC	<i>Side scatter</i>
TAU	Triacetyluridin
TdT	Terminale Deoxynucleotidyltransferase
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>

TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
VL	Viruslast
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Abbildungen

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Mitochondriums.	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Atmungskettenkomplexe in der Mitochondrienmembran.....	7
Abbildung 3: Charakteristischer Ablauf des Zelltodes einer Zelle: Apoptose im Gegensatz zur Nekrose.....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Apoptosesignalwege.	10
Abbildung 5: Struktur und Genkarte des HIV-1.....	12
Abbildung 6: Zentrifugenröhrchen vor bzw. nach der Dichtegradientenzentrifugation	20
Abbildung 7: Punktwolkendiagramm der peripheren mononukleären Blutzellen, Auftragung nach Größe und Granularität	24
Abbildung 8: Punktwolkendiagramme der Lymphozyten vor und nach Depolarisierung durch FCCP-Zugabe	25
Abbildung 9: Prinzip der Annexin Färbung.	26
Abbildung 10: Punktwolkendiagramm der peripheren mononukleären Blutzellen, Auftragung nach Größe und Granularität	27
Abbildung 11: Punktwolkendiagramm der Lymphozyten, Auftragung der Ereignisse aus Fluoreszenzkanal 1 gegen die Ereignisse aus FL2	27
Abbildung 12: Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials zwischen der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und der der gesunden Probanden	32
Abbildung 13: Vergleich der Apoptoserate zwischen der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und der der gesunden Probanden.....	32
Abbildung 14: Vergleich der CD4+ Zellzahl zwischen der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und der der gesunden Probanden.....	34
Abbildung 15: Korrelation zwischen dem mitochondrialen Membranpotential und Apoptoserate in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	40
Abbildung 16: Korrelation zwischen dem mitochondrialen Membranpotential und Apoptoserate in der Gruppe der gesunden Probanden.....	40

Abbildung 17: Korrelation zwischen dem CD4 ⁺ Nadir-Wert und dem mitochondrialen Membranpotential und in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	41
Abbildung 18: Korrelation zwischen dem CD4 ⁺ -Wert am Tag der Untersuchung und dem mitochondrialen Membranpotential in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	42
Abbildung 19: Korrelation zwischen dem CD4 ⁺ Nadir-Wert und der Apoptoserate in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	43
Abbildung 20: Korrelation zwischen dem CD4 ⁺ -Wert am Tag der Untersuchung und der Apoptoserate in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	43
Abbildung 21: Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials in Bezug auf die Höhe des CD4 ⁺ Nadir-Wertes bei der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten;.....	44
Abbildung 22: Vergleich der Apoptoserate in Bezug auf die Höhe des CD4 ⁺ Nadir-Wertes bei der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	45
Abbildung 23: Korrelation zwischen der HI-Viruslast und dem mitochondrialen Membranpotential in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	46
Abbildung 24: Korrelation zwischen Infektionsdauer und Apoptoserate in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	47
Abbildung 25: Korrelation zwischen Infektionsdauer und Apoptoserate bei kürzer als 100 Monate HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	47
Abbildung 26: Korrelation zwischen Infektionsdauer und mitochondrialem Membranpotential in der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	48
Abbildung 27: Korrelation zwischen Infektionsdauer und mitochondrialem Membranpotential bei kürzer als 100 Monate HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten.....	49
Abbildung 28: Vergleich der logarithmisch dargestellten HIV-Last bei HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten mit einer Infektionsdauer kürzer, bzw. länger als 100 Monate;.....	50

Abbildung 29: Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) zwischen den Frauen der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und denen der Gruppe der gesunden Probanden.....	51
Abbildung 30: Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) zwischen den Männern der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und denen der Gruppe der gesunden Probanden.....	52
Abbildung 31: Vergleich der Apoptoserate zwischen den Männern der Gruppe der HIV-infizierten, bisher untherapierten Patienten und denen der Gruppe der gesunden Probanden.....	52

7.3 Tabellen

Tabelle 1: Genprodukte des HIV-1	13
Tabelle 2: Zellpopulationen nach Annexin V-FITC / PI Doppelfärbung im FL1 / FL2 Dot Plot	26
Tabelle 3: Gegenüberstellung der Charakteristika und Meßparameter der untersuchten Gruppen	36
Tabelle 4: verwendete Geräte und deren Hersteller	71
Tabelle 5: verwendete Materialien zum Einmalverbrauch und deren Hersteller	72
Tabelle 6: verwendete Blutproben, Chemikalien, Reagenzien und Nährmedien	73
Tabelle 7: verwendete Software	74

7.4 Literatur

- Abbate, I., F. Dianzani and M.R. Capobianchi "Activation of signal transduction and apoptosis in healthy lymphomonocytes exposed to bystander HIV-1-infected cells." *Clinical and Experimental Immunology* (2000) 122(3): 374-80.
- Adams, J.M. "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." *Genes and Development* (2003) 17: 2481-95.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, et al. *Molecular Biology of the Cell*.(2002), NCBI / Wiley VCH.
- Alimonti, J. and T.F. Ball, K. "Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS." *Journal of General Virology* (2003) 84: 1649–61.
- Badley, A.D., T. Roumier, J.J. Lum, et al. "Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection." *Trends in Pharmacological Sciences* (2003) 24(6): 298-305.
- Banas, B., B.P. Kost, S. Hillebrand, et al. "Platelets, a typical source of error in real-time PCR quantification of mitochondrial DNA content in human peripheral blood cells." *European Journal of Medical Research* (2004) 9(8): 371-7.
- Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, et al. "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* (1983) 220(4599): 868-71.
- BDBiosciences. "Annexin V Product Spotlight." (2002). From <http://www.bdbiosciences.com/pdfs/npas/01-7900030-10-A.pdf>.
- Bevan, M.J. "Helping the CD8+ T-cell response." *Nature Reviews Immunology* (2004) 8: 595-602.
- Beyer, D. "Hiv gross german.png" (1997). From http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Hiv_gross_german.png
- Brinkman, K., H.J. ter Hofstede, D.M. Burger, et al. "Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway." *AIDS* (1998) 12(14): 1735-44.
- Capaldi, R.A. "Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane." *Biochimica et Biophysica Acta* (1982) 694(3): 291-306.
- Cefai, D., M. Ferrer, N. Serpente, et al. "Internalization of HIV glycoprotein gp120 is associated with down-modulation of membrane CD4 and p56lck together with impairment of T cell activation." *Journal of Immunology* (1992) 149(1): 285-94.
- Cherry, C.L., L. Lala and S.L. Wesselingh "Mitochondrial toxicity of nucleoside analogues: mechanism, monitoring and management." *Sexual health* (2005) 2(1): 1-11.

- Chiappini, F., E. Teicher, R. Saffroy, et al. "Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated or HAART-treated HIV-positive patients." *Laboratory Investigation* (2004) 84(7): 908-14.
- Clavel, F., F. Brun-Vésinett, V. Guétard, et al. "LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa." *Comptes rendus de l' Académie des sciences, Série III, Sciences de la vie* (1986) 302(13): 485-8.
- Cory, S., D.C.S. Huang and J.M. Adams "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." *Oncogene* (2003) 22(53): 8590–607.
- Cossarizza, A. "Apoptosis and HIV Infection: About Molecules and Genes." *Current Pharmaceutical Design*, 2008, 14, 237-244 (2008) 14(3): 237-44.
- Cossarizza, A. and G. Moyle "Antiretroviral nucleoside and nucleotide analogues and mitochondria." *AIDS* (2004) 18(2): 137-51.
- Cossarizza, A., C. Mussini, N. Mongiardo, et al. "Mitochondria alterations and dramatic tendency to undergo apoptosis in peripheral blood lymphocytes during acute HIV syndrome." *AIDS* (1997) 11(1): 19-26.
- Côté, H.C., Z.L. Brumme, K.J. Craib, et al. "Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients." *The New England Journal of Medicine* (2002) 346(11): 811-20.
- de Mendoza, C., A. de Ronde, K. Smolders, et al. "Changes in mitochondrial DNA copy number in blood cells from HIV-infected patients undergoing antiretroviral therapy." *AIDS Research and Human Retroviruses* (2004) 20(3): 271-3.
- de Mendoza, C. and V. Soriano "The role of hepatitis C virus (HCV) in mitochondrial DNA damage in HIV/HCV-coinfected individuals." *Antiviral Therapy* (2005) 10 (Supplement 2): M 109-15.
- Deniaud, A., C. Brenner and G. Kroemer "Mitochondrial membrane permeabilization by HIV-1 Vpr." *Mitochondrion* (2004) 4(2-3): 2223-33.
- Derdeyn, C.A. and G. Silvestri "Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection." *Current Opinion in Immunology* (2005) 17(4): 366-73.
- Doerr, H.W., F.D. Goebel, L. Gürtler, et al., Eds. *Erworbenes Immunschwächesyndrom (AIDS). Die Infektiologie.* (2004) Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag.
- Douek, D.C., J.M. Brenchley, M.R. Betts, et al. "HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells." *Nature* (2002) 417(6884): 95-8.
- Ehrhard, S., M. Wernli, G. Kaufmann, et al. "Effect of Antiretroviral Therapy on Apoptosis Markers and Morphology in Peripheral Lymph Nodes of HIV-Infected Individuals." *Infection* (2008) 36(2): 120-9.

- Ellis, R.E., J. Yuan and H.R. Horvitz "Mechanisms and Functions of Cell Death." Annual Review of Cell Biology (1991) 7: 663-98.
- Fadok, V.A. and P.M. Henson "Apoptosis: Getting rid of the bodies." Current Biology (1998) 8(19): 693-5.
- Fernández Larrosa, P.N., D.O. Croci, D.A. Riva, et al. "Apoptosis resistance in HIV-1 persistently-infected cells is independent of active viral replication and involves modulation of the apoptotic mitochondrial pathway." Retrovirology (2008) 5(19): 1-12.
- Follmann, K.K. Deletion der Untereinheit VIa der Cytochrom c Oxidase in Hefe und heterologe Expression des entsprechenden Rindergens sowie Charakterisierung der Mutanten (1998), Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der Philipps-Universität Marburg. From <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z1999/0061/html/einleit.html>
- Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Fuentes-Prior P, Salvesen GS." Biochemical Journal (2004) 384(2): 201-32.
- Gallant, J., S. Staszewski, A. Pozniak, et al. Favorable lipid and mitochondrial (mt) DNA profile for tenofovir disoproxil fumarate (TDF) compared to stavudine (d4T) in combination with lamivudine (3TC) and efavirenz (EFV) in antiretroviral therapy (ART) naïve patients: a 48 week interim analysis. 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy. (2002) San Diego, CA, USA.
- Gallo, R.C., P.S. Sarin, E.P. Gelmann, et al. "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science (1983) 220(4599): 865-7.
- Gibellini, D., M.C. Re, C. Ponti, et al. "HIV-1 Tat protein concomitantly down-regulates apical caspase-10 and up-regulates c-FLIP in lymphoid T cells: a potential molecular mechanism to escape TRAIL cytotoxicity." Journal of Cellular Physiology (2005) 203(3): 547-56.
- Goebel, F.D., A. Roggenkamp and L. Gürtler, Eds. HIV und AIDS. Klinische Infektiologie. (2000) München Jena, Urban & Fischer.
- Gougeon, M.L. "Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack." Nature Reviews Immunology (2003) 3(5): 392-404.
- Green, D.R. and J.C. Reed "Mitochondria and apoptosis." Science (1998) 281(5381): 1309-12.
- Groux, H., G. Torpier, D. Monte, et al. "Activation-induced Death by Apoptosis in CD4 + T Cells from Human Immunodeficiency Virus-Infected Asymptomatic Individuals" Journal of Experimental Medicine (1992) 175: 331-40.

- Hahn, K., B. Robinson, C. Anderson, et al. "Differential effects of HIV infected macrophages on dorsal root ganglia neurons and axons." *Experimental Neurology* (2008) 210(1): 30-40.
- Hamouda, O. HIV-Prävalenz zwar stabilisiert, aber AIDS bleibt häufigste Todesursache in Afrika und eine der häufigsten Todesursachen weltweit. *Epidemiologisches Bulletin*, Nr. 47. J. Seedat, U. Marcus, W. Kiehlet al.(2007) Berlin, Robert Koch-Institut: 430-33.
- Hamouda, O. Zum Verlauf der HIV Epidemie in Deutschland bis Ende 2007. *Epidemiologisches Bulletin*, Nr. 47. J. Seedat, U. Marcus, W. Kiehlet al.(2007) Berlin, Robert Koch-Institut: 429-30.
- Haugaard, S.B., O. Andersen, S.B. Pedersen, et al. "Depleted skeletal muscle mitochondrial DNA, hyperlactatemia, and decreased oxidative capacity in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy." *Journal of medical Virology* (2005) 77(1): 29-38.
- Hazenberg, M.D., S.v.B. Otto, B.H.B., M. Roos, et al. "Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS." *AIDS* (2003) 17(13): 1881-8.
- Herbein, G., U. Mählknecht, F. Batliwalla, et al. "Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4." *Nature* (1998) 395(6698): 189-94.
- Herbein, G., C. Van Lint, J.L. Lovett, et al. "Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes." *Journal of Virology* (1998) 72(1): 660-70.
- Herbeuval, J.P., J.C. Grivel, A. Boasso, et al. "CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis." *Blood* (2005) 106(10): 3524-31.
- Hoffmeister, H. "Apoptose-german.png" (2005). From <http://de.wikipedia.org/wiki/Apoptose>
- Holm, G., C. Zhang, P. Gorry, et al. "Apoptosis of Bystander T Cells Induced by Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Increased Envelope/Receptor Affinity and Coreceptor Binding Site Exposure." *Journal of Virology* (2004) 78(9): 4541–51.
- Inoue, M., Y. Koga, D. Djordjijevic, et al. "Down-regulation of CD4 molecules by the expression of Nef: a quantitative analysis of CD4 antigens on the cell surfaces." *International Immunology* (1993) 5(9): 1067-73.
- Jacobson, M.D., M. Weil and M.C. Raff "Programmed cell death in animal development." *Cell* (1997) 88: 347-54.

- James, C.O., M.B. Huang, M. Khan, et al. "Extracellular Nef protein targets CD4+ T cells for apoptosis by interacting with CXCR4 surface receptors." *Journal of Virology* (2004) 78(6): 3099-109.
- Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, et al., Eds. *Das Versagen der Immunabwehr. Immunologie.*(2002) Heidelberg Berlin, Spektrum akademischer Verlag
- Kahn, J.O. and B.D. Walker "Acute human immunodeficiency virus type 1 infection." *The New England Journal of Medicine* (1998) 339(1): 33-9.
- Kakuda, T.N. "Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity." *Clinical Therapeutics* (2000) 22(6): 685-708.
- Karow, T. and R. Lang, Eds. *Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage.(2001) Bergisch-Gladbach, Druckerei F. Hansen.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie and A.R. Currie "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British Journal of Cancer* (1972) 26(4): 239-57.
- Koopman, G., C.P. Reutelingsperger, G.A. Kuijten, et al. "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." *Blood* (1994) 84(5): 1415-20.
- Korber, B., C. Brander, B.F. Haynes, et al. "Theoretical Biology and Biophysics." *HIV Molecular Immunology Database* (1999). from www.hiv.lanl.gov
- Laforge, M., F. Petit, J. Estaquier, et al. "Commitment to apoptosis in CD4(+) T lymphocytes productively infected with human immunodeficiency virus type 1 is initiated by lysosomal membrane permeabilization, itself induced by the isolated expression of the viral protein Nef." *Journal of Virology* (2007) 81(20): 11426-40.
- Leist, M. and M. Jüttelä "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2001) 2(8): 589-98.
- Lenardo, M.J., S.B. Angleman, V. Bounkeua, et al. "Cytopathic killing of peripheral blood CD4(+) T lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 appears necrotic rather than apoptotic and does not require env." *Journal of Virology* (2002) 76(10): 5082-93.
- Lewis, W. "Mitochondrial dysfunction and nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy: experimental clarifications and persistent clinical questions." *Antiviral Research* (2003) 58(3): 189-97.
- Löffler, G. "Zelluläre Organellen und Strukturen." *Biochemie und Pathobiochemie* (1998) 6: 176-201.

- Losa, G.A. and R. Graber "Spontaneous apoptosis, oxidative status and immunophenotype markers in blood lymphocytes of AIDS patients." *Analytical Cellular Pathology* (2000) 21(1): 11–20.
- Lugli, E., L. Troiano, R. Ferraresi, et al. "Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis." *Cytometry, Part A* (2005) 68(1): 28-35.
- Lum, J.J., O.J. Cohen, Z. Nie, et al. "Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis." *Journal of Clinical Investigation* (2003) 111(10): 1547-54.
- Maagaard, A., M. Holberg-Petersen, E.A. Kvittingen, et al. "Depletion of mitochondrial DNA copies/cell in peripheral blood mononuclear cells in HIV-1-infected treatment-naïve patients." *HIV Medicine* (2006) 7(1): 53-8.
- Macho, A., M.A. Calzado, L. Jiménez-Reina, et al. "Susceptibility of HIV-1-TAT transfected cells to undergo apoptosis. Biochemical mechanisms." *Oncogene* (1999) 18(52): 7543-51.
- Macho, A., M. Castedo, P. Marchetti, et al. "Mitochondrial dysfunctions in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers." *Blood* (1995) 86(7): 2481-7.
- Mandy, F.F., J.K.A. Nicholson and J.S. McDougal "Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus." *Morbidity and Mortality weekly. Recommendations and Reports* (2003) 52(RR02): 1-13.
- Mathur, A., Y. Hong, B.K. Kemp, et al. "Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes." *Cardiovascular Research* (2000) 46(1): 126-38.
- McComsey GA, W.U. "Role of mitochondria in HIV lipodystrophy: insight into pathogenesis and potential therapies." *Mitochondrion* (2004) 4(2-3): 111-18.
- Miró, O., S. López, E. Martínez, et al. "Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals." *Clinical Infectious Diseases* (2004) 39(5): 710-6.
- Miura, T., M. Goto, N. Hosoya, et al. "Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy." *Journal of Medical Virology* (2003) 70(4): 497-505.
- Morgello, S., D. Wolfe, E. Godfrey, et al. "Mitochondrial abnormalities in human immunodeficiency virus-associated myopathy." *Acta Neuropathologica* (1995) 90(4): 366-74.
- Neumeister, B. and J. Brückel, Eds. *Klinikleitfaden für Labordiagnostik.* (2003) München Jena, Urban & Fischer.

- Nicholson, J.K.A., B.M. Jones and M. Hubbard "CD4 T-Lymphocyte Determinations on Whole Blood Specimens Using a Single-Tube Three-Color Assay." *Cytometry* (1993) 14(6): 685-9.
- Nie, Z., G.D. Bren, S.R. Vlahakis, et al. "Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves procaspase 8 in vivo." *Journal of Virology* (2007) 81(13): 6947-56.
- Núñez, M., V. Soriano, M. López, et al. "Coinfection with hepatitis C virus increases lymphocyte apoptosis in HIV-infected patients." *Clinical Infectious Diseases* (2006) 43(9): 1209-12.
- Pantaleo, G. and R.A. Koup "Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know." *Nature Medicine* (2004) 10(8): 806-10.
- Peraire, J., O. Miró, M. Saumoy, et al. "HIV-1-infected long-term non-progressors have milder mitochondrial impairment and lower mitochondrially-driven apoptosis in peripheral blood mononuclear cells than typical progressors." *Current HIV Research* (2007) 5(5): 467-73.
- Petit, F., B. Fromenty, A. Owen, et al. "Mitochondria are sensors for HIV drugs." *Trends in Pharmacological Sciences* (2005) 26(5): 258-64.
- Phenix, B.N. and A.D. Badley "Influence of mitochondrial control of apoptosis on the pathogenesis, complications and treatment of HIV infection." *Biochimie* (2002) 84(2-3): 251-64.
- Picker, L.J. "Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection." *Current Opinion in Immunology* (2006) 18(4): 399-405.
- Polo, R., S. Martinez, P. Madrigal, et al. "Factors associated with mitochondrial dysfunction in circulating peripheral blood lymphocytes from HIV-infected people." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (2003) 34(1): 32-6.
- Rothen, M., S. Gratzl, H.H. Hirsch, et al. "Apoptosis in HIV-infected individuals is an early marker occurring independently of high viremia." *AIDS Research and Human Retroviruses* (1997) 13(9): 771-9.
- Rubbert, A. and B. Gehrens, Eds. *Pathophysiologie der HIV-Infektion. HIV.NET 2007*. (2007) Wuppertal -Beyenburg, Steinhäuser Verlag.
- Ruiz, M. "Diagram of a animal mitochondrion." (2006). From http://www.associatedcontent.com/article/106193/what_is_mitochondrial_disease.html.
- Samuelsson, A., C. Broström, N. van Dijk, et al. "Apoptosis of CD4+ and CD19+ cells during human immunodeficiency virus type 1 infection--correlation with clinical progression, viral load, and loss of humoral immunity." *Virology* (1997) 238(2): 180-8.

- Sarkar, S., V. Kalia and R.C. Montelaro "Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque CD4+ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing." *Cryobiology* (2003) 47(1): 44-58.
- Schulze-Osthoff, K. „In tödlicher Mission: Apoptose, Killerproteasen und Erkrankungen.“ *Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität 2002*, Medizinische Fakultät, Düsseldorf. From <http://www.uni-duesseldorf.de/home/Jahrbuch/2002/PDF/pageeschulzeosthoff.pdf>
- Shi, B., U. De Girolami, J. He, et al. "Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system." *Journal of Clinical Investigation* (1996) 98(9): 1979-90.
- Sternfeld, T., M. Schmid, A. Tischleder, et al. "The influence of HIV infection and antiretroviral therapy on the mitochondrial membrane potential of peripheral mononuclear cells." *Antiviral Therapy* (2007) 12(5): 769-78.
- Su, L., H. Kaneshima, M. Bonyhadi, et al. "HIV-1-induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathogenicity and infection of progenitor cells in vivo." *Immunity* (1995) 2(1): 25-36.
- Taya, N.T., Y., M. Shindo, K. Hirai, et al. "Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C." *British Journal of Haematology* (2000) 110(1): 89-97.
- Troiano, L., R. Ferraresi, E. Lugli, et al. "Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry." *Nature Protocols* (2007) 2(11): 2719-27.
- Van Cruchten, S. and W. Van den Broeck "Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis." *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* (2002) 31 (4): 214-23.
- Vander Heiden, M.G., N.S. Chandel, E.K. Williamson, et al. "Bcl-xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria." *Cell* (1997) 91: 627-37.
- Varbanov, M.E., L. Biard-Piechaczyk, M. "Mechanisms of CD4 T-Cell Depletion Triggered by HIV-1 Viral Proteins." *AIDS* (2006) Reviews(8): 221-36.
- Vayssier-Taussat, M., S.E. Kreps, C. Adrie, et al. "Mitochondrial membrane potential: a novel biomarker of oxidative environmental stress." *Environmental Health Perspectives* (2002) 110(3): 301-5.
- Walker, U.A. "Lactic acidosis in HIV-patients--diagnosis and treatment." *MMW Fortschritte der Medizin* (2004) 146(1): 65-7.
- Walker, U.A. and N. Venhoff "Uridine in the prevention and treatment of NRTI-related mitochondrial toxicity." *Antiviral Therapy* (2005) 10(Supplement 2): M 117-23.

- Wasmuth, J.C., K.H. Klein, F. Hackbarth, et al. "Prediction of imminent complications in HIV-1-infected patients by markers of lymphocyte apoptosis." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (2000) 23(1): 44-51.
- Westendorp, M.O., R. Frank, C. Ochsenbauer, et al. "Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120." *Nature* (1995) 375(6531): 497-500.
- White, A.J. "Mitochondrial toxicity and HIV therapy." *Sexually transmitted Infections* (2001) 77(3): 158-73.
- Willey, R.L., F. Maldarelli, M.A. Martin, et al. "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4." *Journal of Virology* (1992) 66(12): 7193-200.
- Wochna, A., E. Niemczyka, C. Kuronob, et al. "A possible role of oxidative stress in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis." *Mitochondria* (2007) 7(1-2): 119-24.
- Xu, X.N., B. Laffert, G.R. Screaton, et al. "Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain." *Journal of Experimental Medicine* (1999) 189(9): 1489-96.
- Zauli, G., D. Gibellini, P. Secchiero, et al. "Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway." *Blood* (1999) 93(3): 1000-10.
- Zhang, L., W. Yu, T. He, et al. "Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor." *Science* (2002) 298: 995-1000.

8 Danksagung

Herzlichen Dank allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben!

Die vorliegende Arbeit wurde in der Infektionsabteilung der Medizinischen Poliklinik des Klinikums der Ludwig-Maximilians Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Johannes Bogner angefertigt.

Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. Bogner für die Übernahme der Doktorvaterschaft, für die kritische Überprüfung der vorliegenden Arbeit, für die vielen guten Ratschläge und die praktische Unterstützung danken.

Vielen Dank an Dr. Thomas Sternfeld für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung, besonders für das Korrekturlesen und die unbeirrte Motivation.

Dankeschön an das ganze Team der Infektionsabteilung für die kollegiale Atmosphäre und Hilfestellung, im Speziellen an Mathias Schmid für die detaillierte Einarbeitung in die Methodik.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich Marietta Rottenkolber vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der LMU München danken.

Herzlichsten Dank meiner Omi, Karin Simmer und meinen Eltern für ihre liebevolle Begleitung und ihren Beistand!

Nicht zu vergessen meine Korrekturleser Nina, Bernie und Mirela: vergelt's Gott!

9 Lebenslauf

Annette Tischleder

geboren am 08. April 1975

in Trier

Ausbildung, Qualifikationen und beruflicher Werdegang

Seit 01/2005	Infektionsabteilung der Medizinischen Poliklinik, LMU-München Doktorandin im wissenschaftlichen Arbeitskreis Mitochondriale Toxizität
09/04-01/05	Zertifikatskurs Clinical Pharmacy, Universität von Tübingen und London Pharmacy School, GB
03/03-12/04	Stachus-Apotheke, München, Apothekerin
02/2003	3. Staatsexamen Pharmazie Approbation als Apothekerin
12/02–02/03	Apotheke zur Münchener Freiheit, PTA
05/02-10/02	University of Florida, College of Pharmacy, Gainesville, USA Zweiter Teil des Pharmaziepraktikums
11/01-04/02	Marien-Apotheke, München Erster Teil des Pharmaziepraktikums
09/2001	2. Staatsexamen Pharmazie
1999–2001	Studium der Pharmazie an der Universität Würzburg
08/2000	Le Diplôme d'Université Perfectionnement Français Langue Etrangère, Universität von Montpellier, Frankreich
08/1999	1. Staatsexamen Pharmazie
1997–1999	Studium der Pharmazie an der Universität Greifswald
05/97-11/97	Römer-Apotheke, Trier, PTA
04/1997	Staatliche Prüfung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin
1994–1997	Staatliche Lehranstalt für pharmazeutisch-technische Assistenten, Trier
06/1994	Abitur am Friedrich–Wilhelm Gymnasium Trier
1988–1994	Friedrich-Wilhelm Gymnasium Trier
1986–1988	Treviris-Gymnasium Trier
1982-1986	Grundschule Trier-Irsch